



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
CORREGULADORES DEL RECEPTOR DE
ANDRÓGENOS HUMANO EN CÁNCER DE PRÓSTATA
RECURRENTE**

T É S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Biol. SARA JIMÉNEZ LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Elizabeth Langley McCarron

México, D.F.

Septiembre de 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Apoyos recibidos para la realización de esta tesis:

Beca proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CONACYT N° Becario 182485.

Beca proporcionada por la Dirección General de Estudios de Posgrado
DEGEP

Proyecto PAPIIT N° 202003

**UN PROFUNDO AGRADECIMIENTO A LOS MIEMBROS DE MI
COMITÉ TUTORIAL INTEGRADO POR:**

Dra. María Alicia González Manjares

Dra. Julieta Ivone Castro Romero

Dra. Elizabeth Langley McCarron

Porque gracias a ustedes pude asomarme un poquito a lo que significa hacer
ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelitos mamá Cruz y papá Enrique, por su amor y por brindarme su apoyo en los momentos más difíciles de mi vida. LOS QUIERO MUCHO.

A mi mamá Vicenta López Jiménez, por darme la oportunidad de vivir.

A mis hermanos Jorge, José Luis, Miguel, Lala, Nacho y Malena, por su apoyo incondicional y porque se que siempre puedo contar con ustedes.

A la Dra. Elizabeth, por aceptarme como su alumna y dejarme trabajar en su laboratorio.

A Enrique Sánchez Alcántara, porque gracias a sus enseñanzas, paciencia y palabras de aliento me ayudó a cumplir el sueño de terminar mi maestría.

A Chucho, por ser mi amigo y porque gracias a ti tuve material limpio para trabajar y poder terminar mi maestría.

A Claudia y Blanquita, por gracias a ellas mi estancia en laboratorio fue agradable al brindarme un ambiente limpio para trabajar.

A mi maestro Alfonso Esquivel Herrera, por creer en mi y transmitirme el entusiasmo por la ciencia.

A Arturo Velasco González, por iniciar y terminar este sueño conmigo, por tu paciencia y por haber estado a mi lado siempre que te he necesitado. TE QUIERO.

Finalmente a la vida, por haberme dado otra oportunidad y por todas sus enseñanzas, que aunque algunas han sido muy difíciles me han ayudado a crecer como persona.

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
ABREVIATURAS.....	8
ANTECEDENTES.....	10
ANDRÓGENOS Y ANTIANDRÓGENOS.....	10
ANDRÓGENOS.....	10
TESTOSTERONA (T).....	11
DIHIDROTESTOSTERONA (DHT).....	12
OTROS ANDRÓGENOS.....	13
ANTIANDRÓGENOS.....	14
FLUTAMIDA.....	15
BICALUTAMIDA.....	16
ACETATO DE CIPROTERONA.....	17
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.....	18
LOCALIZACIÓN CROMOSOMAL Y ESTRUCTURA DEL GEN.....	18
DOMINIOS FUNCIONALES.....	19
FUNCIÓN DE AR.....	24
MECANISMOS MOLECULARES.....	25
SEÑALES NO GENÓMICAS DEL AR.....	26
CORREGULADORES.....	29
COACTIVADORES.....	30
MECANISMOS DE ACCIÓN DE COACTIVADORES.....	31
CORREPRESORES.....	31
MECANISMOS DE ACCIÓN DE CORREPRESORES.....	32
CÁNCER DE PRÓSTATA.....	34
CÁNCER DE PRÓSTATA RECURRENTE.....	35
COMPORTAMIENTO DE AR EN CaP NORMAL Y RECURRENTE.....	37
COACTIVADORES EN CÁNCER DE PRÓSTATA.....	38

CORRESPONDIENTES EN CÁNCER DE PRÓSTATA.....	39
DIAGNÓSTICO	39
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.....	40
JUSTIFICACIÓN.....	41
HIPÓTESIS.....	43
OBJETIVOS.....	43
METODOLOGÍA.....	44
SUBCLONACIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS HUMANO.....	44
TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i>	44
SISTEMA DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS.....	45
PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN.....	46
ENSAYO PARA CUANTIFICAR β-GALACTOSIDASA.....	47
ENSAYO EN CULTIVO LÍQUIDO.....	48
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS E IDENTIFICACIÓN DE INSERTOS.....	49
MINIPREP DE PLÁSMIDOS DE DNA POR LISIS ALCALINA.....	50
MINIPREP PARA PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS DE QIAGEN.....	51
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE β-GALACTOSIDASA.....	52
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNA TOTAL DE LEVADURAS.....	52
RESULTADOS.....	55
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	80
PERSPECTIVAS.....	81
REFERENCIAS.....	82
ANEXO I (Medios de cultivo, buffers y soluciones).....	95

ABREVIATURAS

ABP. Proteína de unión a andrógeno
AD. Dominio de activación
Ade. Adenina.
AF1. Región de transactivación 1.
AF2. Región de transactivación 2.
AR. Receptor de andrógenos.
ARE. Elemento de respuesta a andrógenos.
 β -gal. β -galactosidasa.
Ca²⁺. Calcio.
CAG. Citosina-adenina-guanina.
Caja CoRNR. Caja de correpresores del receptor nuclear.
CBP. Proteína de unión a CREB.
CDC37. Proteína 37 del ciclo de división celular.
CpG. Islas citosina-guanina
CHIP. Proteína que interactúa con HSP70.
CoRNR. Caja de proteínas correpresoras.
CPA. Acetato de ciproterona.
CsCl. Cloruro de cesio.
CWR1. Cáncer de próstata recurrente.
Cyt C. Citocromo C oxidasa subunidad II.
Cyt B. Citocromo B.
DBD. Dominio de unión a DNA.
DHEA. Dehidroepiandrosterona
DHT. Dihidrotestosterona.
EGF. Factor de crecimiento epidermal
ER. Receptor de estrógenos.
GR. Receptor de progesterona.
hAR. Receptor de andrógenos humano.
H12. Hélice 12.
HAT. Acetiltransferasa de histonas.
HDAC. Desacetilasas de histonas.
H1FX. Miembro X de la familia de las histonas 1.
His. Histidina.
HSP70. Proteína de choque térmica 70.
HSP90. Proteína de choque térmico 90.
hnRNPL. Ribonucleoproteína nuclear heterogénea L.
IGF. Factor de crecimiento parecido a insulina.
Gln. Glutamina.
Gly. Glicina.
kb. Kilo bases
lacZ.
LBD. Dominio de unión a ligando.
Leu. Leucina.
LH. Hormona luteinizante
LH-RH. Hormona liberadora de gonadotropinas.
LHRHA. Análogo hormonal de LH-RH.

LiAc. Acetato de litio
LNCaP. Línea celular de cáncer de próstata.
MAPK. Proteína cinasa mitógeno-activada.
MEL1
MPM. Marcador de peso molecular.
NcoR. Sitio de unión de correpresores del receptor nuclear.
NHS. Transcrito variante 7 parecido a NHSL1.
NLS. Señal de localización nuclear.
NTD. Dominio aminoterminal.
NR. Receptores nucleares.
NSM. Motivo señal del NTD de AR.
ONPG. O-nitrofenil β-D-galactopiranosido.
ORF. Marco abierto de lectura.
pb. Pares de bases
PBX3. Factor de transcripción 3.
PEG.
PHB2. Prohibitina 2.
PIC. Complejo de preiniciación.
PKA. Proteína cinasa A.
PNAS. Proteína relacionada con la diferenciación/apoptosis NB4.
PR. Receptor de progesterona.
PSA. Antígeno prostático específico.
RIDs. Dominios de interacción a receptores.
RPL3P4. Pseudogen de la proteína ribosomal L3.
RPL3. Proteína ribosomal L3.
P.RibS11. Proteína ribosomal S11.
P.RibS16. Forma parte del RNA ribosomal S16 RNR2.
SD. Medio Sabraud Dextrose.
Ser. Serina.
SERF2. Secuencia EDRK rica en factor 2
SMRT. Mediador del silenciamiento de los receptores de hormona tiroidea y retinoide.
SHR. Receptor de hormona esteroide.
SRC. Coactivadores de receptores esteroideos.
T. Testosterona.
TFIIB. Factores de transcripción IIB.
TIF2. Factor intermediario transcripcional 2.
TIFs. Factores intermediarios de la transcripción.
TIP60. Proteína que interactúa con Tat de HIV de 60 kDa.
TR. Receptor de hormona tiroidea.
TRI12. Proteína 12 que interactúa con el receptor de hormona tiroidea (TR).
Trp. Triptofano.
UbiqB. Ubiquitina B.
Ubiq3. Ubiquinona 1 alfa subcomplejo 3 (NADH).
Ubiq5. Ubiquinona 1 alfa subcomplejo 5 (NADH).
VEGF. Factor de crecimiento vascular endotelial.
3-4 AT. 3-4 amino triazol
17-OHP. 17-hidroxiprogesterona.
20S. Subunidad C2 del proteosoma 20S

RESUMEN

El cáncer de próstata es uno de los problemas más frecuentes de salud en los varones. En México, este tipo de cáncer constituye el 14.2% de los diagnosticados, y el 11.85% como causa de mortalidad por tumores malignos. En sus etapas iniciales, el cáncer de próstata es dependiente de andrógenos para su proliferación, sin embargo, después de la terapia de privación de andrógenos, los tumores se vuelven recurrentes, lo cual dificulta su tratamiento y puede causar la muerte.

El receptor de andrógenos (AR) juega un papel esencial, tanto en el crecimiento inicial del cáncer de próstata como después de la pérdida de la sensibilidad a andrógenos. El AR es un receptor de hormona esteroide (SHR) que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y está constituido por varios dominios funcionales. Recientemente, se han propuesto varios mecanismos sobre el comportamiento del AR en cáncer de próstata recurrente. Entre ellos se encuentra la activación del AR mediada por varios correguladores que modulan la actividad transcripcional de genes blanco. Se han encontrado cambios en la expresión de varios correguladores y en su unión al AR, llevando a un crecimiento de cáncer de próstata andrógeno-refractario.

Por lo tanto, en el presente trabajo se tuvo como objetivo identificar cofactores celulares que regulen la actividad del receptor de andrógenos humano en presencia de antagonistas en cáncer de próstata recurrente. Para ello, se utilizó el sistema doble híbrido en levaduras, empleando el AR humano completo tratado con flutamida como carnada. Se tamizó una genoteca de cáncer de próstata recurrente humano (CWR-R1), se aislaron los plásmidos que expresaron proteínas que interactuaron con AR y se determinó su secuencia. Los insertos se identificaron con la ayuda del programa BLAST.

Se encontraron proteínas de varios compartimientos celulares. Las proteínas nucleares encontradas fueron: 1) H1FX, Miembro x de la familia de las histonas

1, 2) Ubiquitina B, 3) Subunidad C2 del proteosoma 20S, 4) PHB2, Prohibitina 2, 5) hnRNPL, Ribonucleoproteína nuclear heterogénea L, 6) TRI12, Proteína 12 que interactúa con el receptor de hormona tiroidea, y 7) PBX3 Factor de transcripción 3. Las citoplásmicas y ya descritas son: 1) HSP90, Proteína de choque térmico 90, y 2) CDC37, proteína 37 del ciclo de división celular. Las ribosomales: 1) Proteína ribosomal S11, 2) RNR2, Forma parte del RNA ribosomal S16, 3) RPL3P4, Pseudogen de la proteína ribosomal L3, 4) RPL3, Proteína ribosomal L3. Mitocondriales: 1) Ubiquinona 1 alfa subcomplejo 3 (NADH), 2) Ubiquinona 1 alfa subcomplejo 5 (NADH), 3) Citocromo C oxidasa subunidad II (3 veces), 4) Citocromo B. Adicionalmente, se encontraron proteínas no descritas como son: 1) Proteína relacionada con la diferenciación/apoptosis NB4, 2) Transcrito variante 7 parecido a NHSL1, 3) mgc 23909 Proteína hipotética con sitio para N-glicosilación, 4) SERF2, secuencia EDRK rica en factor 2, 5) Secuencia no descrita que puede ser ortóloga con alguna de *Mus musculus*.

En conclusión, se aislaron proteínas que no han sido reportadas interactuando con hAR, se encontraron proteínas reportadas como hipotéticas y uno de los principios del sistema doble híbrido es encontrar este tipo de secuencias para su posterior caracterización y sería interesante determinar si realmente están interactuando con AR, si esta interacción se da ubicuamente o si sólo se presenta en cáncer de próstata recurrente.

ABSTRACT

Prostate cancer is one of the most frequent health problems in men. In Mexico, it constitutes 14.2% of all diagnoses and 11.85% as cause for mortality due to malignant tumors. In its initial stages, prostate cancer is androgen dependent for proliferation, however, after androgen ablation therapy, tumours may become hormone-independent, making treatment more difficult and can lead to death.

The androgen receptor (AR) plays an essential role in both the initial growth of prostate tumors and in proliferation of recurrent cancer. AR is a steroid hormone receptor (SHR) that belongs to the nuclear receptor superfamily and is constituted by different functional domains. Several mechanisms for AR behaviour in recurrent prostate cancer have recently been proposed. Among them there is AR activation by several coregulators that modulate transcriptional activity at target genes. Changes in coregulator expression and binding to AR have been suggested to play a role in growth of androgen-refractory prostate cancer.

The objective of the present work is to identify cellular cofactors that regulate human androgen receptor activity in the presence of antagonist ligands in recurrent prostate cancer. For this we used the yeast two-hybrid system utilizing the full-length human AR treated with flutamide as bait and screened a human recurrent prostate cancer library (CWR-R1). The plasmids that expressed AR interacting proteins were isolated and sent to be sequenced. The DNAs were identified using the program BLAST.

We found possible interacting proteins from various cellular compartments. The nuclear proteins found are: 1) H1FX, H1 histone family, member X, 2) Ubiquitin B, 3) 20S proteasome subunit C2, 4) PHB2, prohibitin 2, 5) hnRPL, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L, 6) TRI12, thyroid hormone receptor interactor 12, 7) PBX3, pre-B-cell leukemia transcription factor 3. The cytoplasmic proteins found and previously described to interact with AR are: 1)

HSP90, heat shock 90kDa protein 1, alpha 2) CDC37, cell division cycle 37. The ribosomal proteins found are: 1) Ribosomal protein S11, 2) RNR2, 16S ribosomal RNA, 3) RPL3P4, ribosomal protein L3 pseudogene 4, 4) RPL3, ribosomal protein L3. Mitochondrial proteins: 1) NDUFA3, dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 3, 2) NDUFA5, dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 5, 3) Cyt C (3 times), cytochrome c oxidase subunit II, 4) Cytochrome b. Additionally, we found proteins that have not been previously described, including: 1) PNAS-119, NB4 apoptosis/differentiation related protein, 2) NHSL1, NHS-like 1, transcript variant 7, 3) hypothetical protein mgc 23909, 4) SERF2, small EDRK-rich factor 2, and 5) non-described sequence from *Mus musculus*.

In conclusion, we isolated proteins that have not been previously described interact with AR, we found proteins reported as hypotheticals and one of the principle the yeast two-hybrid system is found these type of sequences for a back characterize and will be interested known if really are interacting with AR, if this interaction is ubiquitously or only in recurrent prostate cancer.

ANTECEDENTES

ANDRÓGENOS Y ANTIANDRÓGENOS

ANDRÓGENOS

Los andrógenos son hormonas sexuales esteroideas masculinas, derivados del colesterol, tienen como estructura básica el ciclopentanoperhidrofenantreno, su función principal es la de estimular el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos. Los andrógenos, básicamente la testosterona, son producidos por los testículos, y solamente el 10% de los andrógenos tiene origen suprarrenal.

Los andrógenos ejercen una variedad de efectos biológicos en muchos órganos blanco, incluyendo genitales masculinos, próstata, cerebro y tejido esquelético. Estas hormonas actúan vía el AR, y regulan el crecimiento y diferenciación de células en la próstata. Esas acciones son mediadas a través del control transcripcional de un conjunto particular de genes blanco del AR (Miyata *et. al.*, 2003; Ikeda *et. al.*, 2005).

Además, se sugiere que el corazón también puede ser un tejido blanco de los andrógenos, debido a que su receptor se expresa en cardiomiocitos de mamíferos. Así mismo, se ha mostrado que los andrógenos producen hipertrofia cardíaca por un mecanismo directo del receptor (Ikeda *et. al.*, 2005).

Los principales andrógenos en el plasma del varón son la testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT), los cuales tienen numerosas acciones en el desarrollo embrionario así como en la pubertad y la etapa adulta (Xiao *et. al.*, 2005).

TESTOSTERONA (T)

La testosterona es un andrógeno, esteroide de estructura de ciclopentanoperhidrofenantreno, tiene 19 átomos de carbono, un doble enlace entre C4 y C5, un átomo de oxígeno en C3 y un radical hidroxilo (OH) en C17. (Figura 3)

Las células de Leydig del testículo son el lugar de síntesis principal de la testosterona a partir del colesterol. También, se puede sintetizar en la corteza suprarrenal y en las células tecales del ovario. La hormona luteinizante (LH), es la hormona reguladora específica de la producción de la testosterona (Maita *et. al*, 2004). Otras hormonas que influyen en grados variables sobre la síntesis de la testosterona, son la prolactina, el cortisol, la insulina, factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF), estradiol, e inhibina. El colesterol es transformado por enzimas mitocondriales en pregnenolona, que es el precursor de la testosterona, vía 17-alfa-pregnenolona como se muestra en la figura 1.

Aunque las células de Sertoli, producen testosterona en cantidades limitadas, sintetizan una proteína transportadora de andrógenos, ABP (proteína de unión a andrógenos), que sirve para fijar la testosterona en el testículo y es la proteína específica en el transporte de testosterona por la circulación sanguínea (Cummings, *et. al*, 2004; Lue *et. al*, 2005 y Auchus, 2004).

La testosterona producida por las células de Leydig, es la que pasa a la circulación sanguínea. El contenido de testosterona en el testículo humano es de aproximadamente 300 ng/g de tejido y la concentración plasmática de testosterona en el adulto normal es de 300 a 1000 ng/dl. Antes de la pubertad la concentración es menor a 20 ng/dl (Cummings *et. al*, 2004; Maita *et. al*, 2004; Goto *et. al*, 2005).

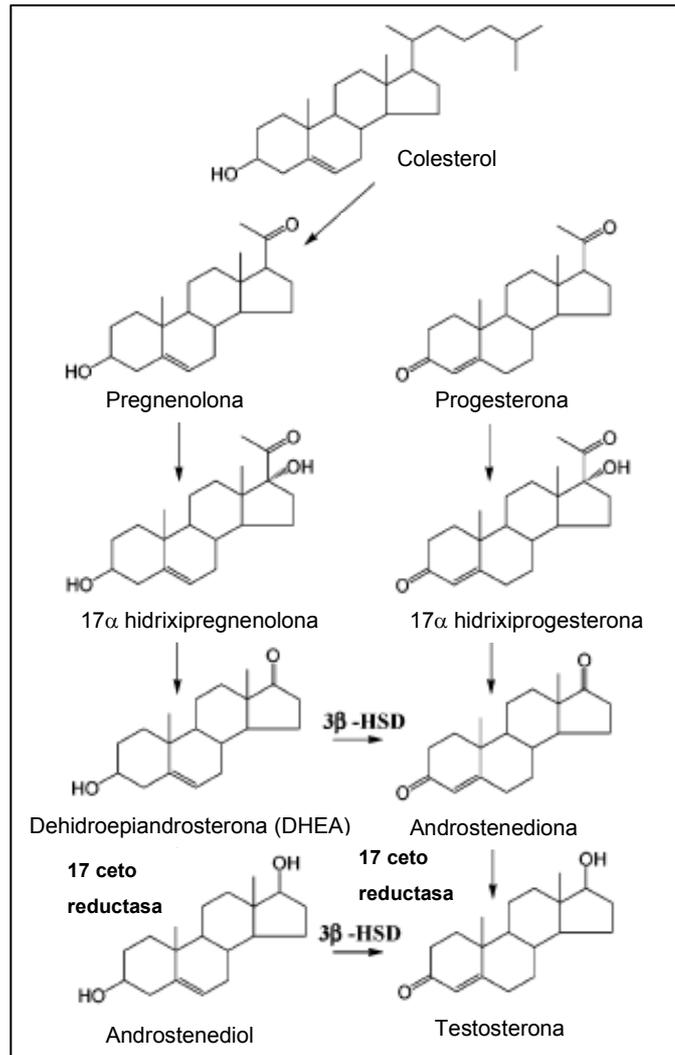


Figura 1 .- Vías de síntesis de testosterona. HSD hidroxí esteroide deshidrogenada.
Modificada de Gao *et. al*, 2005.

DIHIDROTESTOSTERONA (DHT)

La 5 α -dihidrotestosterona (DHT) es un andrógeno no aromático. La enzima 5 α -reductasa es responsable de la conversión de T a DHT el más potente agonista de AR debido a que tiene mayor afinidad por este (Hickey *et. al.*, 2005).

Esta hormona, es la responsable de la formación de los genitales externos masculinos durante la embriogénesis y participa en los eventos de la pubertad masculina. Las razones de la importancia de la 5 α -reductasa no son claras por completo pero se sabe que DHT se une más fuertemente a AR y activa la

transcripción de genes relevantes a más bajas concentraciones que T. La 5 α -reductasa se expresa en bajas concentraciones en los testículos, y DHT se sintetiza de la circulación de T en tejidos blanco de andrógenos, entre ellos la próstata (Miyata *et. al*, 2003; Titus, *et. al*, 2005).

Aparte de la síntesis de DHT en células blanco a partir de T, las enzimas esteroidogénicas humanas catalizan eficientemente todos los pasos requeridos en la ruta a DHT que no involucran intermediarios de T, por una vía llamada vía de la puerta trasera (figura 2). Esta ruta alternativa de la producción de DHT podría explicar cómo los andrógenos son producidos en algunas condiciones normales y patológicas cuando la vía convencional de biosíntesis de andrógenos falla. Además, podría proveer un nuevo enfoque efectivo para manejar desordenes andrógeno-dependientes.

Esta vía de la puerta trasera, se ha encontrado en el epitelio de marsupiales, en testículos neonatales de varias especies de roedores y además es probable que se encuentre en ovarios de mujeres con hiperandrogenemia ovárica debido a la acumulación exagerada de 17 α -hidroxiprogesterona (Auchus, 2004).

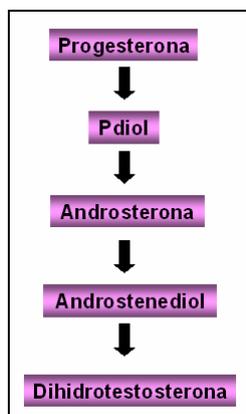


Figura 2.- Vía “Backdoor” o de la puerta trasera, una vía alterna para la biosíntesis de DHT a partir de progesterona en algunas células.

OTROS ANDRÓGENOS

Existen otros andrógenos en los varones, que se despliegan en concentraciones inmedibles en el suero, como 17-hidroxiprogesterona (17-

OHP) y androstenediona que tiene alta afinidad de unión al LBD de AR y es probable que estos compuestos sirvan como sustrato para la formación de andrógenos más potentes en varios tejidos no endocrinos periféricos.

Por otra parte, andrógenos suprarrenales circulantes en bajas cantidades, que se convierten con eficacia en DHT en el tejido fino de la próstata, dentro de este grupo se encuentran DHEA o dehidroepiandrosterona, androstendiona, androstandiol, androsterona y androstenolona (Hero *et. al*, 2005).

ANTIANDRÓGENOS

Los antiandrógenos son agentes que bloquean la acción de andrógenos endógenos al competir por los sitios de unión en el AR. En este sentido, se han sintetizado antiandrógenos esteroideos y no esteroideos. Los segundos son más favorables para aplicaciones clínicas porque no hay unión inespecífica con otros receptores esteroideos, lo que mejora su actividad terapéutica (Bohl *et. al*, 2005).

Los antiandrógenos no esteroideos son frecuentemente utilizados en conjunción con agonistas o antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (LH-RH), para disminuir la producción y circulación de andrógenos testiculares y tratar el cáncer de próstata avanzado (Li *et. al* 2005).

En la figura 3 se muestra una comparación estructural entre andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) y antiandrógenos utilizados comúnmente (flutamida, bicalutamida y acetato de ciproterona).

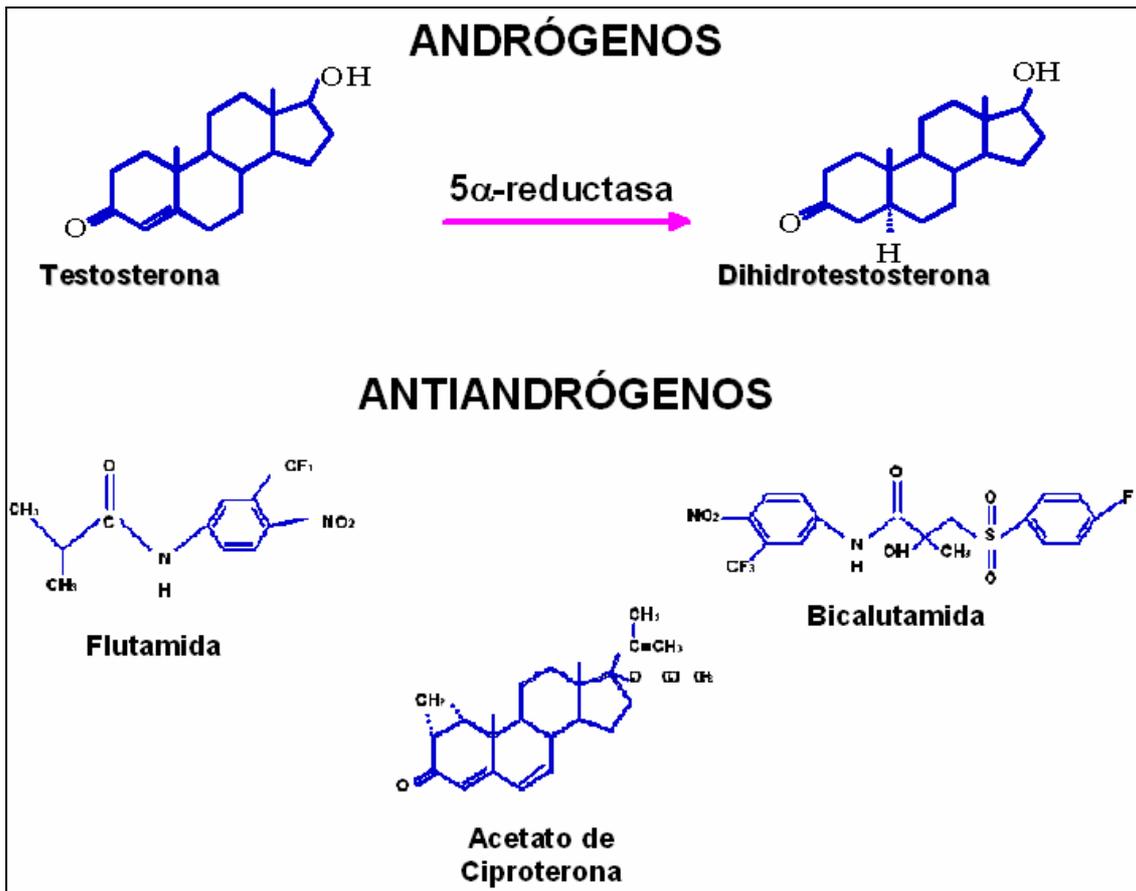


Figura 3. Estructura esquemática de los andrógenos T y DHT, y los antiandrógenos flutamida, bicalutamida y acetato de ciproterona

FLUTAMIDA

Fue el primer antiandrógeno no esteroideo aprobado para el cáncer de próstata en 1989 (Bohl *et. al*, 2005). Es una prodroga que en un primer paso metabólico produce un metabolito activo biológicamente denominado 2-hidroxi-flutamida. Sin embargo, el tratamiento con flutamida es asociado con un mínimo pero existente riesgo de falla hepática, además, disminuye el cortisol libre tanto en hombres adultos como en niños (Hero *et. al*, 2005).

Se ha encontrado que la flutamida claramente inhibe la inducción de la testosterona y esto influye en el comportamiento sexual masculino de ratas, así como, la intromisión y la eyaculación. Algunos estudios mencionan que la exposición a flutamida en la etapa perinatal causa una reducción en la

densidad y frecuencia de células positivas a AR en el tracto urogenital de fetos masculinos de ratas (Cummings *et. al*, 2004; Goto *et. al*, 2005).

BICALUTAMIDA

De una estructura clásica de los antiandrógenos en 1995 fue lanzada la bicalutamida (Casodex), hasta la fecha es la droga más potente y mejor tolerada. Al igual que la flutamida, es utilizada en conjunción con leuprolida u otros superagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (LH-RH) para bloquear la producción de los andrógenos endógenos. Sin embargo, en los estudios clínicos realizados con bicalutamida por sí solo para el tratamiento de cáncer de próstata, se observan elevaciones en la testosterona sérica y el estradiol (Bohl *et. al*, 2005).

La mayoría de las moléculas de bicalutamida se unen en un plano similar como DHT; sin embargo, en el grupo hidroxilo quiral se dobla en una región no ocupada por DHT. Adicionalmente, se ha observado que no afecta la unión de AR al DNA (Xiao *et. al*, 2005; Bohl *et. al*, 2005).

Se ha observado que la bicalutamida, es capaz de inhibir significativamente la proliferación de líneas celulares de CaP humano AR positivas y de cultivos primarios de células de CaP obtenidas directamente de muestras clínicas de una manera dosis respuesta. En presencia de bicalutamida, el factor de crecimiento epidermal (EGF) tiene la capacidad de preservar el crecimiento celular, no obstante, existe la posibilidad de que la bicalutamida pueda interferir con la actividad de su receptor.

El incremento en la estimulación del crecimiento celular, sugiere que las células tratadas con bicalutamida llegan a ser más sensibles a factores de crecimiento exógeno y esta característica puede permitir a las células evitar el requerimiento de andrógenos (Festuccia, *et. al*, 2005).

ACETATO DE CIPROTERONA

El acetato de ciproterona (CPA) es un antiandrógeno esteroideo con propiedad progestacional, que generalmente es utilizado en clínica como un contraceptivo, así como para el tratamiento de cáncer de próstata e hirsutismo (Pichard y Ferry 2004).

Tiene acción dual, como un bloqueador del receptor de andrógenos periférico y como un agente central en el hipotálamo para disminuir los niveles totales de testosterona en el suero, como si se tratara de una castración. Por lo tanto puede ser considerado como terapia antihormonal única que bloquea a los andrógenos y puede ser utilizado como monoterapia en el tratamiento de cáncer de próstata avanzado.

Sin embargo, CPA es comúnmente dado antes de la primera dosis de LHRHA (análogo hormonal de la hormona liberadora de gonadotropinas (LH-RH)) para inducir abruptamente a la testosterona. Existe poca literatura de cómo CPA disminuye los niveles de testosterona en el suero, sin embargo se piensa que es debido a su efecto progestacional (Appu, *et. al* 2005)

Además, se ha observado que el CPA compite con DHT y T por el LBD de AR e inhibe la actividad transcripcional del receptor, tanto en células de mamíferos como en diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Ju, *et. al*, 2003). Por otra parte, se ha mostrado que CPA induce la síntesis de reparación de DNA, probablemente porque genera especies reactivas de oxígeno que pueden atacar el material genético (Siddique y Afzal, 2005)

RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

EL hAR, LOCALIZACIÓN CROMOSOMAL Y ESTRUCTURA DEL GEN

El receptor de andrógenos humano (hAR) es una proteína de 110 kDa (Jasuja, *et. al.*, 2005), con una variación de 910 a 919 aminoácidos dependiendo de la longitud de sus repeticiones polimórficas de glutamina y glicina en la región NH₂ terminal. Como se observa en la figura 4, se transcribe de un gen que tiene 8 exones A-H, localizado en el cromosoma X (Xq11-12). El gen está orientado con el extremo 5' hacia el centrómero y fragmentos de ~ 90 kb de DNA que contienen 8 exones que codifican para un RNAm de ~10.6 kb con ~ 2,757 pb en marco abierto de lectura (Lubahn, *et. al.*, 1988).

El primer exón codifica para el dominio NH₂ terminal (NTD) que es una región regulatoria transcripcional de la proteína, además, contiene una región de repetición de CAG que codifica para glutamina (Q) es denominada secuencia de poliglutamina, en el AR humano empieza en el aminoácido 57. Los exones 2 y 3 codifican para el dominio central de unión a DNA (DBD) y los exones 4 a 8 para la región COOH terminal de unión a ligando (LBD). (Germann, 2002; Kuiper *et. al.*, 1989).

AR es miembro de la subfamilia de receptores esteroides (SHRs) y ésta a su vez pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (NR) que al ser activados por ligando (Aranda *et. al.*, 2001), sufren una serie de cambios conformacionales que les permite interactuar con elementos de respuesta sobre el DNA, para regular la transcripción de genes blanco. Los ligandos fisiológicos del AR son DHT y la T (Gregory *et. al.*, 2001; Lue, *et. al.*, 2005).

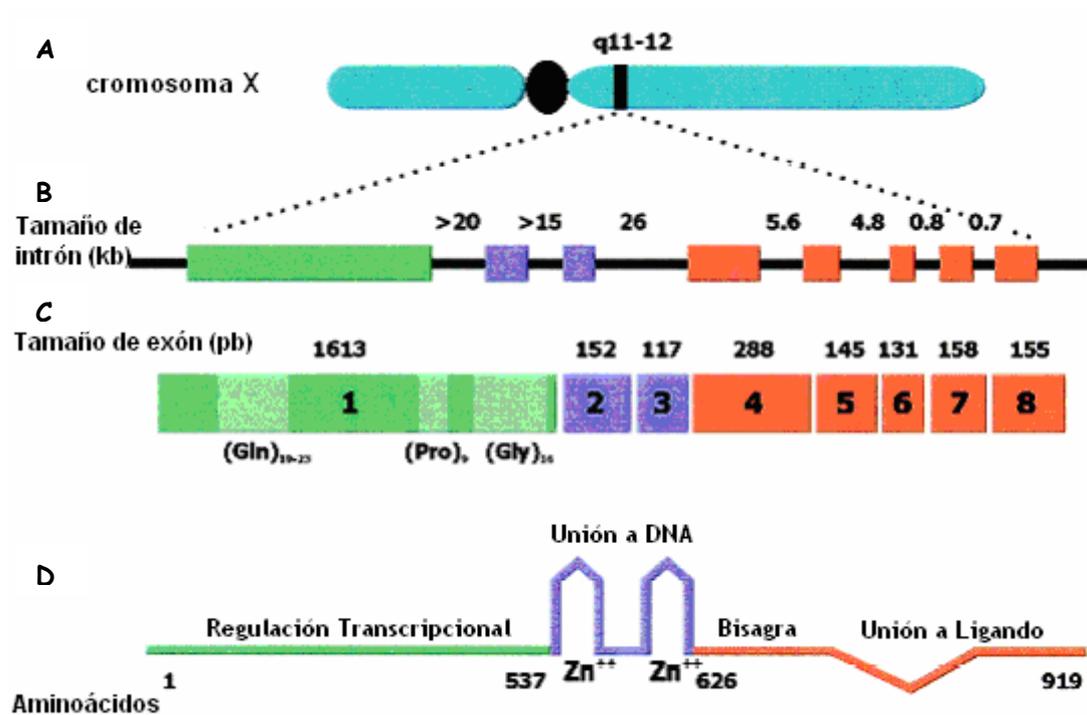


Figura 4.- (A) Organización genómica del gen de AR, (B) organización exónica, (C) localización y tamaño de los exones en pb que codifican para los tres dominios funcionales de AR, además se puede observar el número de repeticiones para glutamina (Gln), prolina (Pro) y glicina (Gly) del dominio NH₂ terminal, y en (D) estructura proteica demostrando como la organización de los exones se traducen en regiones funcionales discretas del receptor. (Gelman, 2002)

DOMINIOS FUNCIONALES

Al igual que otros receptores nucleares (NR), el AR está constituido por varios dominios funcionales: una región variable amino terminal (NTD), que tiene un dominio de transactivación ligando independiente AF1; una región central conservada, que contiene el dominio de unión a DNA (DBD); una región variable o bisagra que conecta el DBD a la región conservada carboxilo terminal que contiene el dominio de unión al ligando (LBD) y una zona de activación transcripcional denominada AF2, cuya actividad de transactivación depende de la unión de ligando (Aranda *et. al.*, 2001; Xu y Li, 2003). A diferencia de otros NR, el AR presenta su mayor función de transactivación en el dominio NH₂-terminal (AF1). (Dotzlaw *et. al.*, 2003; Jasuja, *et. al.*, 2005). Detalles de la estructura de AR se muestran en la figura 5.

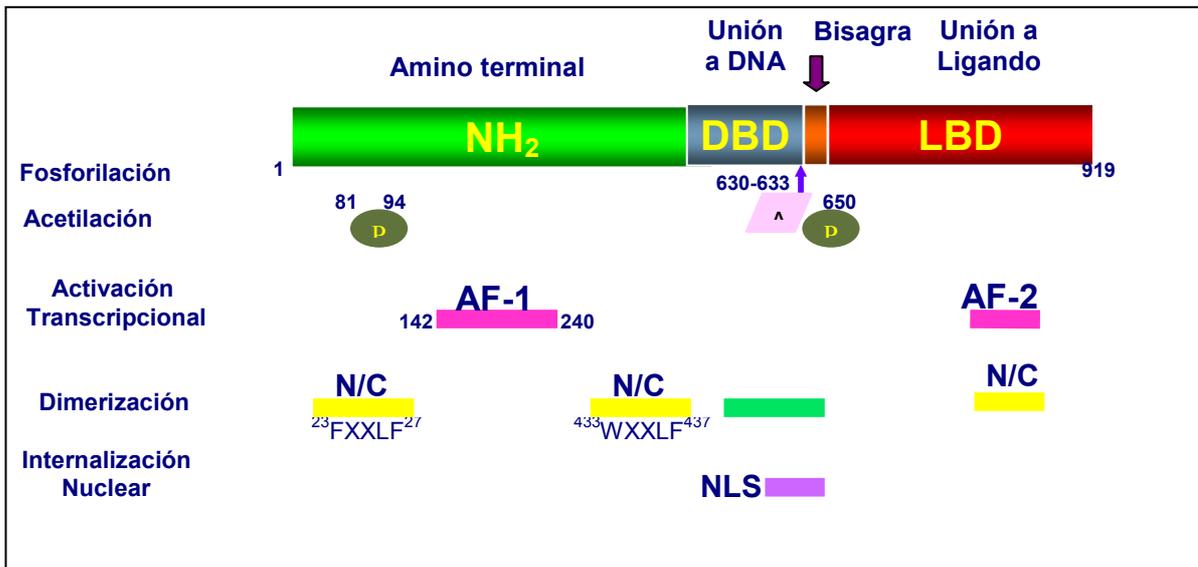


Figura 5.- Dominios y regiones descritas del receptor de andrógenos humano (hAR)

DOMINIO NH₂ TERMINAL (NTD)

La región amino-terminal del AR incluye los primeros 503 aminoácidos de la proteína. La estructura de el NTD de AR incluye una α -helice que se extiende sobre la región conservada NSM (motivo señal del NTD de AR) y el residuo E231 como un determinante crítico de la actividad transcripcional de AR, sugiriendo que su estructura es crítica para el reclutamiento de factores transcripcionales. Como ejemplo, recientemente se ha mostrado que el AR-NTD interactúa directamente con la proteína CHIP (proteína que interactúa con HSP70), la cual funciona como un regulador negativo de AR en la actividad transcripcional; estos datos confirman que esta región tiene un motivo conservado evolutivamente que probablemente juega un papel crítico en la modulación de la acción de AR (Han *et. al*, 2005).

Además, la región amino-terminal de los SHR es la menos conservada evolutivamente y no es de sorprenderse que esta región en AR tenga algunas características funcionales únicas comparadas con otros miembros de la familia, especialmente por que es una de las de mayor extensión. Los primeros 140 aminoácidos no son esenciales para la actividad transcripcional, su

delección da como resultado niveles de actividad transcripcional similares a los del AR silvestre (Aranda y Pascual, 2001; Brinkmann *et. al*, 1999).

Adicionalmente, es la región efectora primaria y es en gran parte responsable de la transactivación de AR. A diferencia de otros SHRs cuya actividad es atenuada por la delección del LBD. La delección del LBD del AR da como resultado un fragmento residual NH₂-terminal con actividad constitutiva casi igual a la actividad transcripcional de la proteína completa; sugiriendo que esta región es el sitio primario para la interacción de AR con los coactivadores que amplifican la señal transcripcional y median la acción de AR. Sin embargo, se conocen más coactivadores para la región COOH terminal (He *et. al*, 2001).

DOMINIO DE UNIÓN A DNA (DBD)

El AR tiene una región de 66 residuos de aminoácidos denominada DBD y es la mejor conservada entre los SHRs. Esta región incluye ocho residuos de cisteínas que forman dos complejos coordinados con dos iones de Zn²⁺, denominados dedos de zinc. Estos dos dedos forman la estructura que se une al surco mayor del DNA, el segundo dedo de zinc estabiliza al complejo de unión por interacciones hidrofóbicas con el primer dedo y contribuye a la unión específica del receptor al DNA en los elementos de respuesta a andrógenos (AREs). Así mismo, esta región es necesaria para la dimerización del receptor (Gelman, 2002).

Por otro lado, los AREs en el DNA están compuestos por dos secuencias palindrómicas de hexanucleótidos y separados a la mitad por un espacio de tres nucleótidos. El AR se puede unir a residuos de guanina como se indica en la siguiente secuencia RGAACA-NGN-TGTNCT, o también a una segunda clase de secuencia RGGACA-NNA-AGCCAA, que median la cooperación entre receptores de unión adyacente y enhancers de respuesta específica a andrógenos (Reid, *et. al*, 2001)

Además, se ha observado que el DBD aislado y asociado a la extensión COOH terminal son necesarios y suficientes para generar el mismo patrón de selectividad de elementos de respuesta del DNA y de dimerización; aunque la unión de ligando tiene distintas respuestas específicas a hormonas. En este sentido, el DBD del AR unido a sus elementos de respuesta, revela una unión del dímero cara – cola al DNA, y adicionalmente el DBD requiere de otras interfases de dimerización (Shaffer *et. al* 2004).

BISAGRA

La región de bisagra se encuentra entre el DBD y el LBD, e influye en la localización nuclear de AR, debido a que cuando al receptor se le une su ligando sufre un cambio conformacional y despliega una señal de internalización nuclear (NLS) en esta región. Esta señal es bipartita y se sobrelapa al DBD. Una vez expuesta la NLS, es fosforilada por proteínas cinasas en la Ser 650 (figura 5) y puede ser reconocida por un receptor como importina- α , el cual media la traslocación del AR al núcleo; además esta serina es requerida para la actividad transcripcional de AR (Zhou, *et. al* 1995). Alguna deleción en esta zona, reduce marcadamente la traslocación nuclear ligando-inducida pero no bloquea totalmente la señalización. Esto probablemente se debe a que este receptor puede ser fosforilado por otras vías como la de la proteína cinasa mitogeno-activada (MAPK) o la proteína cinasa A (PKA), y así ser activado de manera ligando-independiente como se observa en la figura 8 (Gioeli *et. al*, 2002; Edwards y Bartlett, 2005).

DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDO (LBD)

En este dominio se encuentra la región de unión al ligando (LBD) y la región de transactivación denominada AF2. Aun cuando la región AF1 del AR parece ser más fuerte que la región AF2, se sabe que estas regiones pueden actuar individualmente ó sinérgicamente para activar la transcripción de genes blanco de manera tejido- o promotor específica.

La estructura cristalográfica del LBD de hAR fue determinada en 2000 por Matias y colaboradores. A pesar de las diferencias substanciales en la secuencia primaria de aminoácidos entre el LBD de AR y otros SHRs, en algunos casos con una muy baja analogía como el 20%, las estructuras tridimensionales de los LBDs de estas moléculas son bastante similares. Los LBDs de estos receptores se doblan en 12 alfa hélices que forman una cavidad de unión a ligando (Figura 6).

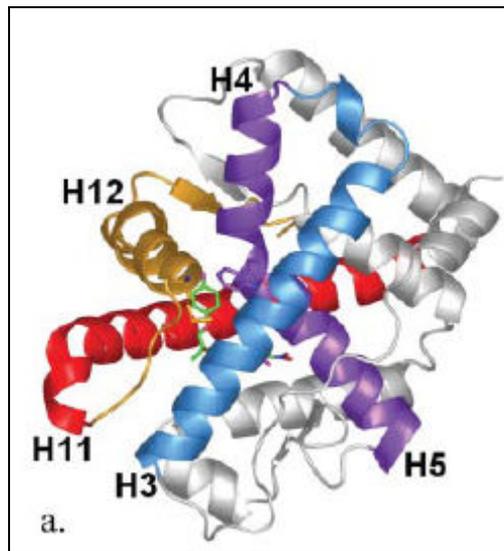


Figura 6.- Estructura del LBD de hAR determinada por cristalografía en presencia de ligando (Bohl, *et. al*, 2005).

En el citoplasma, el AR se asocia con un complejo de proteínas de choque térmico como HSP90 y HSP70 que funcionan como chaperonas para mantener el LBD en una conformación competente para la unión del ligando (Cheng *et. al*, 2002; Sharma *et. al.*, 2000). Cuando se le une el ligando, sufre un cambio conformacional con la subsecuente disociación de las proteínas de choque térmico. En este momento el receptor expone su señal de localización nuclear y se trasloca al núcleo.

El cambio conformacional ligando-inducido activa a la región de transactivación AF2. Este cambio incluye el movimiento de la hélice 12 del LBD contra las hélices 3 y 5, tapando la cavidad que contiene al ligando y generando una

pequeña hendidura hidrofóbica que, en el caso de la unión de un ligando agonista como T o DHT, forma un centro hidrofóbico para unir proteínas con secuencias LXXLL (Cheng *et. al.*, 2002). Este motivo generalmente se ha observado en proteínas coactivadoras del AR y otros NRs.

Por otra parte, si se une un ligando antagonista como los antiandrógenos, flutamida, casodex o acetato de ciproterona, el cambio conformacional del LBD es diferente y esto puede provocar un cambio en la unión a proteínas. En algunos de estos casos se ha visto mayor afinidad por proteínas con otro motivo de unión como la caja CoRNR de proteínas correpresoras. Esta caja contiene el motivo LXXI/LXXIL donde “L” es leucina, “X” cualquier aminoácido e “I” isoleucina (Hu, *et. al.*, 2001). Por lo tanto se sugiere que el tipo de ligando (agonista o antagonista) dicta no solo la conformación del receptor, sino también la función y actividad de los corre reguladores (Dotzlaw, *et. al.*, 2003)

Además, se ha mostrado que la región de transactivación denominada AF2 también puede funcionar como un sitio de dimerización que interactúa con la región NH₂ terminal del AR (Langley, *et. al.*, 95; Kumura *et. al.*, 2003). Estudios de mutagénesis han indicado que la interacción andrógeno-inducida entre los dominios NH₂- y COOH- (N/C) terminal del AR incrementa la estabilidad del receptor y está mediada por dos secuencias similares a LXXLL en la región NH₂-terminal del AR (He *et. al.*, 2000). La cual presumiblemente compite con otras proteínas que se unen al LBD que presentan este motivo.

FUNCIÓN DE AR

El AR juega un rol crucial en el desarrollo y mantenimiento de características primarias y secundarias sexuales masculinas (Miyata *et. al.*, 2003). Estudios recientes, han confirmado que la inactivación del gen de AR causa la pérdida completa o disminución del comportamiento sexual masculino, a pesar de tratamientos con hormonas esteroides (Schneider *et. al.*, 2005; Xiao, 2005). Por lo tanto, la función de AR es crítica para el comportamiento típico masculino (Sato *et. al.*, 2004; Shafter, *et. al.*, 2004).

Por hibridación y perfiles de expresión, se ha mostrado que AR regula la expresión de más de 100 genes en la próstata y en líneas celulares de cáncer de próstata, incluyendo a varios genes que son importantes para el crecimiento y diferenciación (Foss, *et. al.*, 2005).

Basados en imágenes de fluorescencia y reconstrucción tridimensional se ha sugerido que el AR unido a agonistas aparece en finos gránulos localizados entre la eucromatina y heterocromatina, sin embargo la estructura fundamental y composición de este compartimiento subnuclear es desconocido. Por otro lado, AR unido a un antagonista, como casodex, se distribuye uniformemente a través del núcleo (Black y Paschal, 2004).

MECANISMOS MOLECULARES

El promotor del gen de *AR*, está localizado en aproximadamente 1000 nucleótidos en dirección 5' del codón de inicio de la traducción. Sin embargo, el análisis de secuencia de esta región no ha mostrado cajas TATA o CAAT en la región 5' en donde empieza el mRNA. En este tipo de genes contienen secuencias ricas en GC en la región 5', en la que se une el factor de transcripción SP1, que puede reclutar a la maquinaria transcripcional (Figura 4). Además los niveles de mRNA de *AR* son regulados por andrógenos y por otras hormonas esteroides como estrógenos y glucocorticoides (Cheol Yi Hong *et. al* 2005; Varriale y Esposito, 2005).

La mayoría de los ARs sin ligando, están localizados en el compartimiento citoplásmico de células blanco y están secuestrados por un complejo de multiproteínas de choque térmico (HSP90 y HSP70) e inmunofilinas. Después de la unión de su ligando, el receptor se disocia del complejo multiprotéico y al sufrir un cambio conformacional, se trasloca al núcleo, en donde se dimeriza y se une a secuencias específicas de DNA e inician la formación de un complejo multiprotéico en la región del promotor (Figura 7), modulando así la expresión de genes de respuesta a andrógenos, y a esto se le denomina mecanismo

clásico de acción o vía de señalización clásica. (Jasuja *et. al* 2005; Ikeda, *et. al*, 2005).

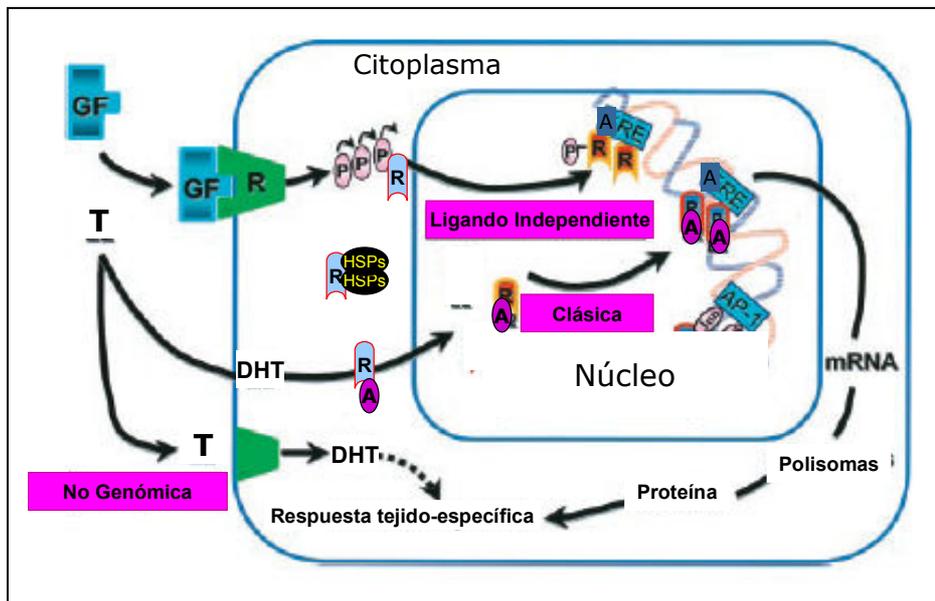


Figura 7.- Mecanismos de acción o vías de señalización de AR. Modificada de Hall *et. al*, 2001.

La acción de AR sobre el promotor de genes blanco, es mediada por un grupo muy diverso de proteínas coactivadoras que interactúan con el AR y median el reclutamiento del complejo de transcripción, para que así se inicie la actividad de la RNA polimerasa. La proximidad de elementos enhancer en la secuencia del DNA puede formar complejos adicionales de transcripción que se alinean con el complejo del promotor primario y amplifican la formación de un complejo transcripcional (Brady *et. al* 1999; Shang, *et. al*, 2002; Schaufele *et. al*, 2005).

SEÑALES NO GENÓMICAS DEL AR

En el paradigma clásico, el AR ejerce su efecto biológico mediante la activación transcripcional de genes blanco, un proceso que es conocido como “señal genotrópica”. En contraste, existen evidencias que sugieren una actividad no genómica del receptor, que es extremadamente rápida e induce la activación de segundos mensajeros de cascadas de transducción de señales incluyendo MAPK, cAMP y alteración de los niveles intracelulares de calcio, esta inducción

no es afectada por inhibidores de síntesis de proteínas ni de transcripción (Heinlein y Chang, 2004). Estas actividades parecen ser llevadas a cabo por un receptor de andrógenos en membrana (Figura 8).

Aunque hay menos información en los posibles roles no genómicos de AR comparado con los de ERs, las acciones no genómicas de andrógenos se han descrito en por lo menos 10 tipos celulares; algunas de estas involucran interacciones entre ligandos y sistemas de receptores no clásicos (Freeman *et. al*, 2005).

Por otro lado, tres isoformas de nuevos PRs de membrana, se han clonado y caracterizado recientemente, demostrando la localización membranal de receptores esteroides que podrían estar involucrados en algunas generaciones de señalización rápida. Dada la estructura similar entre el LBD de los clásicos AR y PR, es posible que un nuevo AR de membrana pueda pertenecer a esta familia (Freeman *et. al*, 2005).

Además, recientemente fue publicado que el AR se asocia con baja densidad en las fracciones de membrana de células LNCaP (línea celular de cáncer de próstata) y muestran que AR interactúa directamente con caveolina-1 una proteína integral de membrana. La caveolina-1 se ha identificado como una proteína marcadora que se asocia con la progresión de CaP (Cáncer de próstata) y la enfermedad hormono-refractaria. Las evidencias indican que la caveolina-1 es un mediador directo de la acción de andrógenos, a través de la vía de señalización PI-3K-Akt y que esta involucrada en metástasis de CaP. En conjunto, estos estudios indican la participación de las “rafts” lipídicas caveolares en los mecanismos de señalización que se presentan en CaP dependiente e independiente de andrógenos y en mecanismos de supervivencia (Freeman *et. al*, 2005).

Otros efectos esteroides no genómicos involucran la movilización de Ca^{2+} de fuentes intracelulares o extracelulares, modificaciones citoesqueléticas y activación de moléculas de señalización, conduciendo a un número de

respuestas finales asociadas con la secreción, crecimiento celular o apoptosis (Kampa *et. al*, 2005).

Adicionalmente, como ya se ha mencionado el AR reside en complejos multiprotéicos en el citoplasma antes de la unión del ligando y su traslocación nuclear, con lo cual existe la posibilidad de interacciones productivas con moléculas en el citosol y en la superficie de la membrana extranuclear que conllevan a la activación de cascadas de transducción de señales citosólicas.

CORREGULADORES

Estudios bioquímicos iniciales han demostrado que varias proteínas denominadas correguladoras, interactúan con AR y modulan su activación transcripcional de manera positiva (coactivadores) o de manera negativa (correpresores). En general, los correguladores por sí mismos no poseen una propiedad específica de unión a DNA. Hay múltiples mecanismos por los cuales los correguladores afectan la activación transcripcional de AR. Algunos correguladores interactúan con el receptor en el promotor del gen blanco, remodelan la cromatina, o reclutan factores generales de transcripción asociados con la RNA polimerasa II (Aranda y Pascual, 2001).

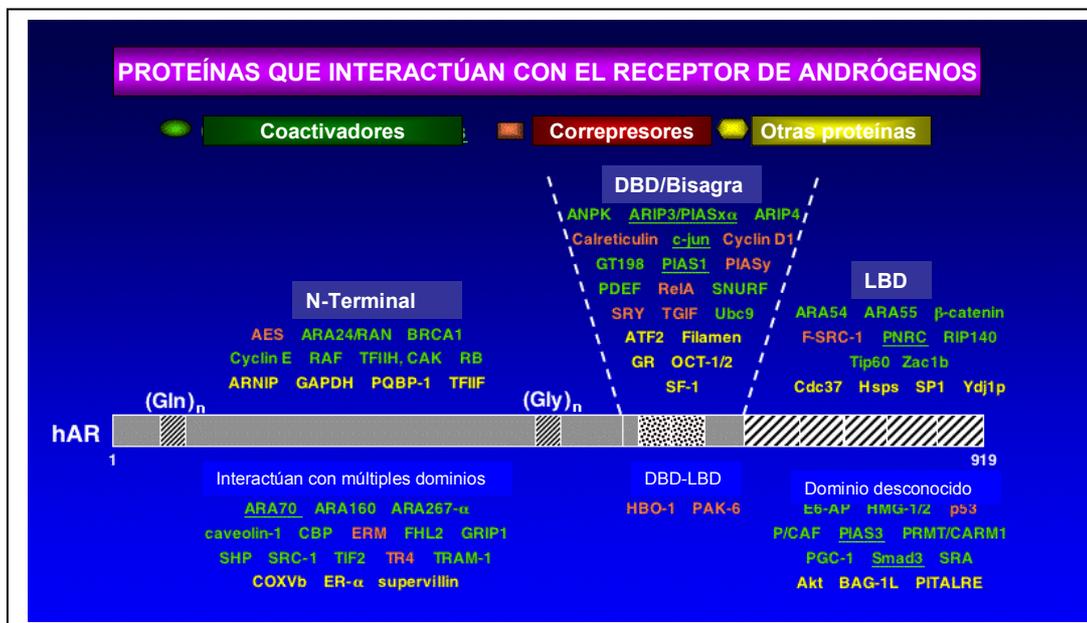


Figura 8.- Se muestran proteínas que interactúan con AR, agrupadas de acuerdo al dominio por el cual interactúan con el receptor, algunas pueden interactuar con diferentes dominios.

(Modificada de Beitel, 2003)

Algunos correguladores, ejercen sus efectos a través de la regulación directa del plegamiento, estabilidad y translocación nuclear, unión a ligando, interacción intramolecular entre los dominios NH₂ y COOH (figura 8) o transducción de señales del AR. Además, algunos correguladores también modulan directamente la capacidad de AR para que reconozca y se una a su secuencia blanco o ARES y subsecuentemente transactive ó no la expresión del gen.

Los detalles precisos de cómo el AR se une a muchas proteínas correguladoras *in vitro* se ha estudiado para varias de estas proteínas, y se asocian con diferentes regiones del receptor, pero *in vivo* es poco entendido. Existen muchos coactivadores y correpresores que se unen a varios factores de transcripción y algunos que son específicos dependiendo del ambiente celular. Se ha sugerido que existe un sistema de rotación de las proteínas que se unen para llevar a cabo todas las actividades involucradas en la activación de la transcripción y subsecuentemente su silenciamiento. Adicionalmente, se ha propuesto que la interacción diferencial de varios correguladores en diferentes tipos celulares depende de su concentración en la célula y su afinidad para cada tipo de receptor. Esto implica que un pequeño cambio en la expresión de correguladores puede tener un dramático efecto en la activación transcripcional de los receptores nucleares (Hur, *et. al*, 2004, Jeong, *et. al*, 2004).

COACTIVADORES

Son proteínas que generalmente no se unen al DNA, pero son reclutadas a la región del promotor a través de interacciones proteína-proteína con AR, usualmente de manera ligando-dependiente. Estos coactivadores aumentan los niveles de transactivación de AR varias veces. Así mismo, al unirse al AR, se cree que aumentan la estabilidad del complejo de preiniciación dando como resultado un incremento de la iniciación transcripcional (Edwards y Bartlett, 2005).

La mayoría de los coactivadores estudiados interactúan con la región AF2 de los receptores nucleares y son dependientes de ligandos agonistas para esta interacción. Los receptores con mutaciones en esta región están inactivos transcripcionalmente debido a que no pueden interactuar con proteínas coactivadoras. En contraste a la actividad de AF2 dependiente del ligando, el mecanismo responsable para la actividad constitutiva de AF1 es poco entendida (Aranda y Pascual, 2001).

MECANISMOS DE ACCIÓN DE COACTIVADORES

En general, los receptores nucleares activados por ligando y unidos a sus elementos de respuesta reclutan un gran número de proteínas coactivadoras. Entre las funciones que pueden tener estos coactivadores se encuentran: 1) Actividad acetiltransferasa de histonas (HAT); 2) Metilación; 3) Remodelación de cromatina; 4) Reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción; 5) Reclutamiento de otros coactivadores; 6) ubiquitin-ligasas; entre otras. Presumiblemente, a través de la remodelación de cromatina y la estabilización del complejo de preiniciación (PIC), ocurre la activación transcripcional de genes blanco (Aranda y Pascual, 2001).

Existen coactivadores que se unen al LBD de AR, específicamente en el AF2, de manera ligando dependiente, a través de motivos ricos en leucina (LXXLL) en una región de los coactivadores llamada caja de receptores nucleares (NR) (Irvine *et. al*, 200; Wafa, 2003; Liang-Nian *et. al*, 2004; Black y Paschal, 2004).

Hur ha cristalizado el LBD del AR y revela que aparte de las cajas NR tradicionales, los motivos de los coactivadores que se unen específicamente al AR son ricos en grupos hidrofóbicos aromáticos y permiten la construcción de una superficie de interacción más amplia que otros receptores nucleares (Hur, 2004).

CORREPRESORES

Los correpresores son factores importantes que no se unen por si mismos al DNA pero median el silenciamiento de genes a través de factores transcripcionales que se unen al DNA. El silenciamiento de la expresión génica se da particularmente mediante la formación de un complejo multiprotéico que mantiene la compactación de la cromatina por medio del reclutamiento de

desacetilasas de histonas. Sin embargo, existen otras proteínas consideradas correpresores que inhiben directamente a los factores de transcripción.

Los correpresores juegan un papel importante en una variedad de procesos incluyendo el desarrollo embriológico, procesos de diferenciación y también en terapias de cáncer. El análisis del mecanismo fundamental provee nuevas revelaciones en el rol transcripcional de correpresores en el sistema endócrino,

MECANISMOS DE ACCIÓN DE CORREPRESORES

El número de correpresores identificados se ha ido incrementando regularmente, lo cual nos ha permitido entender como actúan e interaccionan con el AR y como ocurren las vías de señalización y la regulación transcripcional del mismo (Baniamahad, 2005). Recientes descubrimientos relacionan a los correpresores del AR con diferentes mecanismos como: 1) correpresores que inhiben la unión de AR al DNA; 2) o que inhiben la translocación nuclear de AR; 3) correpresores que reclutan desacetilasas de histonas; 4) correpresores que interrumpen la interacción entre AR y sus coactivadores; 5) correpresores que interrumpen la interacción entre las regiones NH₂ (amino) y COOH (carboxilo) terminal; 6) correpresores que funcionan como escalafones para otros corre reguladores de AR; 7) correpresores que tienen como blanco la maquinaria basal transcripcional; y 8) otros mecanismos (Liang-Nian *et. al*, 2004; Wang, *et. al*, 2004; Baniamahad, 2005; Hur, *et. al*, 2004)

Los mecanismos de silenciamiento de genes mediados por los correpresores ocurren en diferentes niveles. Involucran el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDAC). La actividad de HDAC es contrarrestar la activación de genes mediada por coactivadores reclutando acetil transferasas de histonas (HATs). El reclutamiento de HDAC induce a una estructura mas compacta de la cromatina, se piensa que inhibe la accesibilidad de activadores transcripcionales y factores de transcripción basal (McKenna, *et. al*, 1999).

Un motivo de unión para correpresores reclutados por AR sin ligando, fue identificado para los correpresores SMRT y N-CoR, los cuales tienen un motivo LXXI/LXXIL donde “L” es leucina, “X” cualquier aminoácido e “I” isoleucina, denominado caja CoRNR. Interesantemente, este motivo tiene parecido al motivo de unión de coactivadores requerido para la unión a la región AF2 (Hu, *et. al*, 2001; Baniahamad, 2005).

Se sugiere que el dominio de interacción del correpresor y del coactivador es similar y se “sobrelapa” en la región carboxilo terminal de AR, se propone que el correpresor utiliza una gran superficie de interacción comparada con la que utiliza el coactivador y puede bloquear la interacción del coactivador. El AF2 es una importante región de regulación de reclutamiento de coactivadores y correpresores, en presencia de antagonistas AF2 se orienta de una manera diferente, lo que resulta en una gran cavidad que puede acomodar el motivo de unión del correpresor (Cohen, *et. al*, 2001). Adicionalmente, la unión de correpresores se estabiliza por hormonas antagonistas. Se ha postulado que los niveles celulares de correpresores dictan los niveles de agonismo parcial de algunas antihormonas, sugiriendo que el potencial de la acción de los antiandrógenos es regulado por correpresores. (Dotslaw *et. al*, 2003; Liang-Nian *et. al*, 2004).

Por otro lado, el mapeo de dominios de interacción de AR con correpresores revela que la región amino terminal del receptor también puede ser importante para la unión de estas proteínas. No hay mucha información acerca de la estructura del dominio amino terminal del receptor y no son claros los motivos de interacción de los correpresores en esta región que, como ya se ha mencionado, es la de mayor transactivación en AR.

CÁNCER DE PRÓSTATA

Bajo el nombre genérico de cáncer se engloba un conjunto de enfermedades que tienen en común un crecimiento celular desordenado (tumor) y una colonización tisular (metástasis), todo ello determinado por una mutación inicial seguida de la acumulación de mutaciones sucesivas (Luque y Herraéz, 2001). La primera etapa del desarrollo del tumor, llamada tumorigénesis, carcinogénesis tumoral o transformación neoplásica es la que más se ha estudiado (Luque y Herraéz, 2001).

Cada cáncer es una situación distinta con peculiaridades dependientes del tipo de célula donde se origina, sus causas (etiología), su mecanismo, el grado de malignidad y otros factores (Luque y Herraéz, 2001). Por tanto, el cáncer puede clasificarse de acuerdo con el tejido y el tipo celular a partir del cual se origina. Por ejemplo, los procedentes de células epiteliales (como las células de la próstata) se denominan carcinomas y los que proceden de tejido conjuntivo o de células musculares se denominan sarcomas (Alberts *et. al*, 2002; Coulter, 2005).

La próstata es una glándula muscular en forma de nuez, situada por debajo de la vejiga urinaria; rodea a la porción proximal de la uretra, en el varón, y secreta un líquido alcalino (Tortora y Anagnostakos, 1991). Comprende de 20 a 70 ramificaciones que convergen en 16 a 32 ductos que conectan a la uretra prostática, la cantidad de tejido estromal en próstatas humanas normales es de 45 a 55%, así mismo, la próstata recibe sangre por dos grupos de vasos venosos, el grupo capsular y el grupo uretral. (Wientjes *et. al*, 2005).

Las hormonas tienen un papel primordial en la biología de la próstata, debido a que esta es un órgano blanco principalmente de los andrógenos, que se requieren para el desarrollo, crecimiento y función de la misma. Además las células de este órgano los requieren para estimular su proliferación e inhibir la muerte por apoptosis (Lee *et. al*, 2003; Whitaker, *et. al* 2004).

En este sentido, los efectos androgénicos en el desarrollo prostático son mediados vía el receptor de andrógenos (AR). Este receptor se expresa en células epiteliales y estromales de la próstata y su activación es esencial para el mantenimiento de la glándula prostática en machos adultos. Por otro lado, en ausencia de andrógenos, la próstata se encoge a una forma rudimentaria (Li *et. al*, 2005). Además la próstata es también un órgano blanco para los estrógenos y estos pueden afectar el crecimiento y diferenciación de la misma (Cunha y Tuohimaa, 2004).

Aunque son poco conocidos los eventos moleculares fundamentales que conducen a la progresión del cáncer, las funciones celulares tales como proliferación, muerte celular, motilidad, transducción de señales e interacciones microambientales pueden jugar un rol importante (Miller *et. al*, 2003). En cáncer de próstata se han observado varios mecanismos en los que está involucrado el AR, así como cambios en la expresión de correguladores del mismo.

La incidencia del cáncer de próstata se ha incrementado durante las últimas dos décadas, pero también se dispone de nuevas tecnologías y mejores herramientas para su diagnóstico, especialmente el uso de mediciones en el suero de PSA (antígeno prostático específico). Adicionalmente, el desarrollo del cáncer de próstata ocurre en el contexto de la señalización de hormonas esteroides y el promotor de PSA se activa en respuesta a andrógenos (Herness *et. al*, 2003; Cunha, 2004; Xiao, 2005).

CÁNCER DE PRÓSTATA RECURRENTE

La terapia hormonal para el cáncer de próstata, se inicia suprimiendo la producción de andrógenos con agonistas de la hormona luteinizante, frecuentemente en combinación con antagonistas del receptor de andrógenos. Aunque inicialmente se bloquea en forma efectiva el crecimiento del tumor, esta terapia eventualmente falla, llevando a una etapa resistente a fármacos y uniformemente letal, denominada andrógeno-independiente, hormono-refractaria o recurrente (Chen, *et. al*, 2004; Edwards y Bartlett, 2005).

Este crecimiento tumoral andrógono independiente, puede ser estimulado por la producción local de factores de crecimiento, tales como, factores de crecimiento de insulina I y II (IGF-I y II), factor de crecimiento epidermal, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y otras vías de señalización que afectan la activación de AR (Letsch, 2003).

En la transición del cáncer primario a recurrente, los niveles secretados de antígeno próstata específico (PSA) aumentan, y como el gen que codifica para esta proteína es blanco del AR, indica que el receptor es funcional. En algunos cánceres recurrentes el gen del AR está amplificado y/o sobreexpresado, por lo tanto, se tiene la hipótesis de que en cáncer recurrente la activación de este receptor puede estar dada por andrógenos adrenales. Además, mutaciones en el AR se han asociado con el cáncer de próstata recurrente, debido a que algunas mutaciones en el dominio de unión a ligando (LBD) de AR permiten que funcione con ligandos alternativos, como antiandrógenos utilizados en la terapia de bloqueo hormonal. Adicionalmente, los correguladores están involucrados en esta transición de cáncer de próstata primario a recurrente (Zhang, 2003; Culing, *et. al* 2004; Háág *et. al*, 2005).

El hecho de que la expresión de algunos correguladores incrementa después de la privación de andrógenos es interesante, las células de cáncer de próstata son capaces de adaptarse a ambientes con baja concentración de andrógenos supliendo estos por varios mecanismos, como la activación del receptor independiente de ligando por fosforilación. Esto podría explicar porque el AR regula genes que llegan a ser expresados cuando el tumor regresa. (Hall, *et. al*, 2001; Culing, *et. al*, 2004; Gaughan, 2005).

Por otra parte, la hipermetilación de islas CpG en la región regulatoria de genes andrógono-regulados ha sido observada en más del 90% de tejidos de cáncer de próstata, mientras que no se han observado en tejido prostático normal, sugiriendo un posible fenómeno epigenético como un nuevo biomarcador para el cáncer de próstata (Bastian *et. al*, 2005). Lo anterior, refleja el poco

entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares en los que se basa la progresión y etiología de esta enfermedad.

COMPORTAMIENTO DE AR EN CaP NORMAL Y RECURRENTE

Hay evidencias de que el AR no solo media el crecimiento dependiente de andrógenos, sino también contribuye al crecimiento independiente de andrógenos en tumores de próstata. Un hallazgo importante ha sido que no se pierde la expresión de AR en la progresión del crecimiento del tumor hormona refractario (Gregory, *et. al*, 2001; Háág *et. al*, 2005).

La participación del AR en la transición del cáncer de próstata estimulado por andrógenos a cáncer de próstata recurrente podría incluir mecanismos como, mutaciones en el gen de AR permitiendo su activación en presencia de bajos niveles de testosterona o dihidrotestosterona o la unión de ligandos promiscuos de menor afinidad como los andrógenos adrenales, modificaciones postraduccionales de AR a través de factores de crecimiento por vías de señalización inducidas por receptores de tirosin cinasas o MAPK cinasas o sobreexpresión de coactivadores e inhibición de correpresores (Titus *et. al*, 2005).

Se piensa que el mecanismo está basado en que la activación mediada por vías de crecimiento que funcionan independientes de AR, supera la inhibición del crecimiento causada por terapias antiandrogénicas (Edwards y Bartlett, 2005).

Si bien varios mecanismos han sido propuestos para explicar cómo AR puede facilitar el desarrollo de cáncer de próstata, existen nuevos datos que soportan la hipótesis de que AR es un protooncogén y que el bloqueo de la vía de señalización clásica de AR por mutación o perturbación hormonal puede facilitar el estado de transformación (Han *et. al* 2005).

Aunque el mecanismo preciso por el cual los andrógenos afectan el desarrollo de esta enfermedad no se conoce, al parecer este padecimiento se desarrolla sólo en presencia de andrógenos. Además, el incremento de la señalización de AR puede contribuir a la progresión del tumor y emerger en el fenotipo hormona-independiente (Han *et. al*, 2005; Lim *et. al* 2005).

COACTIVADORES EN CANCER DE PRÓSTATA

Se ha visto que la función de algunos coactivadores en cáncer de próstata es alterada. Por ejemplo, en líneas celulares LNCaP se requiere la presencia de andrógenos para reclutar al coactivador TIP60 al promotor del gen de PSA, en contraste en las sublíneas de LNCaP andrógeno independientes, TIP60 es reclutado al promotor en ausencia de andrógenos (Culing, *et. al* 2004; Gaughan, 2005). Estos experimentos podrían explicar el mecanismo por el cual el AR regula genes que llegan a ser expresados cuando el tumor es recurrente.

También se ha observado, que la expresión de algunos coactivadores incrementa después de la privación de andrógenos en células de cáncer de próstata, esto podría ayudar a estas células a adaptarse a ambientes con baja concentración de andrógenos.

Adicionalmente, en algunos estudios previos se ha demostrado que los niveles del receptor de andrógenos incrementan cuando hay privación de andrógenos durante un largo tiempo; esto podría explicarse por el hecho de que algunos coactivadores están implicados con la regulación del AR al enlazarlo con otras vías de señalización. En varios estudios, hay evidencias de que las propiedades antagonistas de los antiandrógenos se reducen sustancialmente cuando un coactivador se sobreexpresa o cuando bajan la concentraciones de un correpresor. (Culing, *et. al* 2004).

CORREPRESORES EN CÁNCER DE PRÓSTATA

El reclutamiento aberrante de correpresores o la acción multifuncional de correpresores están asociados con una gran variedad de enfermedades. Las bases moleculares de muchas de estas enfermedades es la falta de propiedad de disociación de correpresores de receptores nucleares, llevando a la represión de la expresión de genes a pesar de la presencia de hormonas.

Interesantemente, la asociación de correpresores con AR es importante para la terapia de cáncer de próstata a través de tratamientos con antagonistas hormonales.

En contraparte, uno de los mayores problemas del tratamiento con antagonistas es la resistencia del cáncer a la terapia, la cual está asociada con la pérdida de la inhibición del AR. Una de las explicaciones moleculares es que hay una menor expresión de correpresores ó que han perdido la habilidad para reprimir al AR, y posiblemente activan vías de señalización alternas (Liang-Nian, *et. al*, 2004).

Aunque muchos coactivadores de AR han sido identificados, pocos correpresores se han encontrado y caracterizado. La regulación de la actividad de AR es esencial para llevar a cabo un tratamiento adecuado de cáncer de próstata, así como para desarrollar nuevas terapias.

DIAGNÓSTICO

El cáncer de próstata puede ser diagnosticado en hombres que presentan niveles elevados de PSA en el suero. Los niveles de PSA pueden ser correlacionados con un fenotipo relevante del tumor y servir como un biomarcador de la enfermedad tanto andrógeno dependiente como independiente por lo tanto puede servir de herramienta para diagnosticar

pequeñas lesiones, a las que se le puede hacer un análisis histopatológico para confirmar la presencia de cáncer (Foss *et. al*, 2005).

TRATAMIENTO DEL CANCER DE PRÓSTATA

Cuando se diagnostica en sus etapas iniciales, el tratamiento con cirugía o radiación puede producir una supervivencia de 5 años en el 95% de los pacientes, debido a que en estas etapas, el cáncer de próstata es dependiente de andrógenos para su proliferación (Kikuchi *et. al.*, 2003 y Grzywacz, 2003). Por lo tanto se sugieren tratamientos involucrados en reducir la circulación de los niveles de andrógenos (Whitaker *et. al*, 2004).

Subsecuentemente, la terapia hormonal ha llegado a ser la terapia estándar para etapas avanzadas de la enfermedad, más del 90% de los pacientes muestran respuestas bioquímicas a la terapia. Sin embargo, durante una terapia hormonal prolongada, los pacientes pueden recaer y con el tiempo crear una resistencia a la terapia hormonal y no muestran una sobrevivencia significativa más allá de 2 a 3 años; por lo tanto, no hay un efectivo tratamiento para este tipo de tumores; (Grzywacz, 2003; Linja, 2004).

En este sentido cuando el cáncer de próstata recurre o es diagnosticado en etapas avanzadas, los tratamientos estándares incluyen castración quirúrgica o farmacológica. Desde 1940 Huggins y Hodges mostraron que la castración era un tratamiento efectivo para esta enfermedad (Linja, 2004; Grzywacz, 2003; Han, *et. al*, 2005). Sin embargo, aunque ofrece la erradicación potencial del tumor, causa significantes complicaciones como la impotencia en el 80% de los casos, incontinencia en el 29%, aproximadamente y recurrencia del tumor en el 18% de los pacientes (Wientjes *et. al*, 2005).

La quimioterapia sistémica con drogas citotóxicas como la mitoxantrona, taxana y estramustina son utilizadas para tratar la enfermedad avanzada hormono-refractaria y raramente para la enfermedad localizada (Wientjes *et. al*, 2005). Por lo tanto es necesario encontrar nuevas opciones de tratamiento para detectar y diagnosticar la enfermedad en pacientes jóvenes.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de próstata es uno de los problemas más frecuentes de salud en los varones. En México, este tipo de cáncer constituye el 14.2% de los sujetos diagnosticados, y el 11.85% como causa de mortalidad por tumores malignos. En sus etapas iniciales, el cáncer de próstata es dependiente de andrógenos para su proliferación, sin embargo, después de la terapia de privación de andrógenos, los tumores se vuelven recurrentes, lo cual dificulta su tratamiento y puede causar la muerte.

El desarrollo de tumores prostáticos dependen de la actividad del receptor de andrógenos (AR). Recientemente se ha observado que persiste la actividad transcripcional mediada por el AR en la mayoría de los cánceres de próstata recurrentes. Se han propuesto varios mecanismos sobre el comportamiento del AR en éste tipo de cáncer recurrente. Uno de ellos es la activación del AR por diferentes corre reguladores que modulan la actividad transcripcional del AR sobre genes blanco. Se ha encontrado que existen cambios en la unión de corre reguladores al AR, ya sea por sobreexpresión de coactivadores o disminución en concentraciones de corre presores, favoreciendo el crecimiento del tumor.

Así mismo se ha observado, que la expresión de algunos coactivadores incrementa después de la privación de andrógenos en las células cancerígenas células de cáncer de próstata, lo cual podría ayudar a estas células a adaptarse a ambientes con baja concentración de andrógenos. En varios estudios, hay evidencias de que las propiedades antagonistas de los antiandrógenos se reducen sustancialmente cuando un coactivador se sobreexpresa o cuando bajan la concentraciones de un corre presor. (Culing, *et. al* 2004). Aunque muchos coactivadores del AR han sido identificados, pocos corre presores se han encontrado y caracterizado, por lo que el en el presente trabajo nos enfocamos a la búsqueda de nuevas proteínas capaces de interactuar con el receptor de andrógenos humano.

Por otra parte, el sistema doble híbrido en levaduras se ha utilizado ampliamente desde la década de los 90s, para identificar proteínas correguladoras de receptores esteroides, debido a que permite la identificación y clonación de genes que codifiquen para proteínas que interactúen con una proteína carnada. Esto se puede observar en la figura 9.

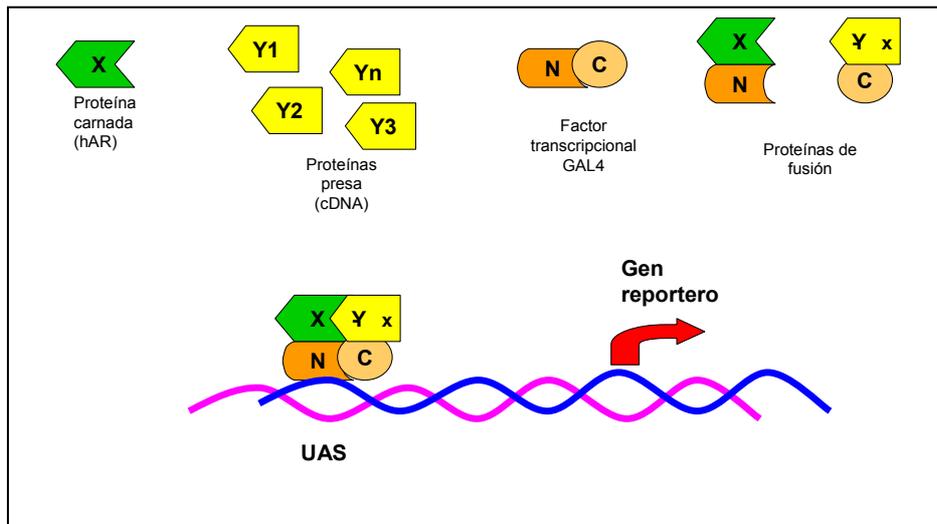


Figura 9.- Sistema doble híbrido, se tiene una proteína carnada (X) y varias proteínas presa (Y), por un lado y por otro se tiene el factor transcripcional GAL4. Se forma una proteína de fusión y al interactuar ambas proteínas pueden activar uno o varios genes reporteros.

HIPÓTESIS

Algunas proteínas expresadas en cáncer de próstata recurrente pueden interactuar con hAR activado por antagonistas y modular la actividad transcripcional del receptor.

OBJETIVOS

GENERAL

Identificar proteínas que interactúan con hAR en presencia de antagonistas, utilizando el sistema doble híbrido en levaduras.

ESPECÍFICOS

- Tamizar una genoteca de cáncer de próstata recurrente utilizando hAR como carnada en presencia de flutamida, mediante el sistema doble híbrido en levaduras.
- Determinar si la interacción se presenta en presencia de bicalutamida y acetato de ciproterona.
- Cuantificar la interacción entre las proteínas encontradas y hAR.
- Purificar los plásmidos e identificar las secuencias de los cDNAs de las proteínas que interactuaron con hAR
- Determinar la actividad específica de la interacción proteína-proteína de
- algunas proteínas encontradas con hAR

METODOLOGÍA

SUBCLONACIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS HUMANO

Se clonó el receptor de andrógenos humano completo en el plásmido de expresión en levaduras pGBKT7, que tiene el dominio de unión a DNA de GAL4, obteniéndolo a partir de 2 plásmidos, debido a que no se tenía la secuencia del receptor en marco abierto de lectura para este vector.

El primer fragmento se obtuvo a partir del plásmido VP-ABC, que incluye los aminoácidos 1-660 de hAR, y se digirió con las endonucleasas NdeI y HindIII para obtener un fragmento de 1692 pb que incluye a los aminoácidos 1-564. El segundo fragmento se obtuvo a partir de pCMV-hAR, que contiene al receptor completo, y se utilizaron las endonucleasas HindIII y BamHI para obtener el fragmento de aminoácidos 564-919 (1065 pb). Por lo tanto se hizo una ligación triple, con el plásmido pGBKT7 digerido con NdeI y BamHI, utilizando ligasa de laboratorios Fermentas dejando la reacción de ligación toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se transformaron *E. coli* de la cepa DH5 α para poder obtener el plásmido pGBKT7-hAR, purificarlo y mandarlo a secuenciar para asegurarnos que el receptor este bien clonado y sin mutaciones.

TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

En 100 μ L de células se agregaron 5 μ L de la reacción de ligación, se dejaron incubando 30 min en hielo y se les dio un choque térmico de 30 seg a 42°C, inmediatamente después se pusieron en hielo por dos minutos, se les agregó 300 μ L de medio SOC y se les incubó a 37°C por 1 hr en agitación constante para que las células se recuperaran. Posteriormente, se sembraron en cajas petri en medio LB con agar y 20 μ g/mL de kanamicina, se incubaron toda la noche a 37° C.

SISTEMA DOBLE HIBRIDO EN LEVADURAS

Se utilizó el sistema “Matchmaker two-hybrid system 3” de Laboratorios Clontech, Inc., siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó como carnada a pGBKT7-hAR y se tamizó una genoteca de cáncer de próstata recurrente humano denominada CWR-R1, que fue construida en el vector pACT2.

El vector pGBKT7, contiene un sitio de múltiples clonaciones en marco abierto de lectura con la región 3' del dominio de unión a DNA (DBD) de GAL4 para construir una proteína de fusión con AR. Tiene dos marcadores de selección, uno es nutricional *TRP1* y es utilizado para selección en levaduras, el otro es de resistencia a kanamicina para seleccionar en *E. coli*. La proteína de fusión se expresa en altos niveles y el plásmido se replica autónomamente tanto en *S. cerevisiae* como en *E. coli*.

Por otro lado, el vector pACT2, genera una proteína de fusión entre el dominio de activación (AD) de GAL4 y una proteína codificada por un cDNA de la genoteca de cáncer de próstata recurrente humano CWR-R1, la proteína híbrida se expresada a altos niveles en la célula hospedera y el vector, también se replica autónomamente en *E. coli* y *S. cerevisiae*, además, contiene el gen *bla* que le confiere resistencia a ampicilina, así como el gen nutricional *LEU2* que le permite a la levadura crecer en un medio auxótrofo.

Cando las proteínas de fusión interactúan, el DBD y el AD de GAL4 se acercan y activan la transcripción de cuatro genes reporteros *ADE2*, *HIS3*, *MEL1* y *lacZ*; bajo el control de distintas secuencias de activación dependientes de GAL4. El reportero *ADE2*, solamente provee fuerte selección nutricional, *HIS3*, reduce la selección de falsos positivos y permite controlar fuertemente la selección. Se tiene la opción de utilizar *MEL1* o *lacZ*, que codifican para α -galactosidasa y β -galactosidasa, respectivamente

Los plásmidos antes mencionados, se cotransformaron en la cepa AH109 de levaduras, que tienen un genotipo *trp1-, leu2-, his3-, gal4Δ, gal80Δ, -ADE2, MEL1, UAS-MEL1, TATA-lacZ*. Las transformantes se crecen en un medio mínimo SD/-Ade-Trp-Leu-His. La ausencia de leucina y triptofano en el medio aseguran que ambos plásmidos se encuentren en cada célula. Adicionalmente, los genes reporteros presentan varios fenotipos, el primero es nutricional, es decir, crecimiento en ausencia de adenina e histidina; el segundo es dependiente de la activación de los genes reporteros *MEL1* y *lacZ*, debido a que en respuesta a la activación de GAL4, AH109 secreta α -galactosidasa que puede ser detectada en medio que contenga X- α -Gal dando un color azul a las colonias, por otra parte exhibe un alto nivel de expresión de la actividad de β -galactosidasa bajo el control de *lacZ*. Como puede haber baja expresión de His3 por otras vías, se utiliza el inhibidor competitivo de esta proteína, 3-amino triazol (3-4 AT), que suprime el crecimiento de fondo en medio SD-His.

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN

1. En 50 mL de medio YPDA se inoculó una colonia fresca de levaduras, se incubó toda la noche a 30°C con agitación de 250 rpm para alcanzar la fase estacionaria ($OD_{600} > 1.5$).
2. Se transfirió el cultivo a un volumen de 300 mL ($OD_{600}=0.2-0.3$), se incubó por 3 hrs a 30°C con agitación de 200 rpm hasta obtener una OD_{600} de 0.5 a 0.8.
3. Las células se pasaron a tubos de 50 mL y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4°C.
4. Se eliminó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 25 mL de TE estéril con vortex y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4°C.
5. El sobrenadante se decantó, las células se resuspendieron en 1.5 mL de TE/LiAc 1X (Preparado al momento, estéril y frío).
6. A otro tubo de 1.5 mL se le adicionó 0.1 μ g de pGBKT7-hAR, 0.2 μ g de genoteca CWR-R1 y 0.1 mg de transportador de DNA de testículos de arenque y 0.1 mL de células competentes (el tubo se mantuvo en hielo)

7. Se le adicionó 0.6 mL de la solución estéril PEG/LiAc (se mezcló por vortex) y se incubaron a 30°C por 30 min con agitación (200 rpm).
8. Se les agregó 70 µL de DMSO y se mezcló por inversión. Posteriormente, se dio un choque térmico por 15 min a 42°C y se enfriaron las células en hielo por 2 min.
9. El tubo se centrifugó a 1500 rpm por 5 seg, se removió el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 0.5 mL de TE para proceder a platear.

Las transformantes fueron seleccionadas en medio Sabouraud Dextrose (SD) – Leu/-Trp/X-Gal y con 100 nM de flutamida. Las clonas positivas (de color azul) se resembraron en un medio selectivo más severo (SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/X-Gal, con 5 y 10 µM de 3-4 amino triazol) para obtener células vivas, eliminar falsos positivos y las clonas en las cuales los dos plásmidos estén interactuando transitoriamente. Además, para garantizar que solo se tuvieran el plásmido carnada y uno de la genoteca por cada clona, se hicieron múltiples resiembras.

Adicionalmente, para determinar si las interacciones son específicas en presencia de flutamida, se resembraron todas las clonas positivas en medio con bicalutamida y acetato de ciproterona, otros dos antiandrógenos. Estudios previos, han demostrado que no se observa activación de β-galactosidasa mediada por AR en presencia de estos antagonistas en cepas de levaduras (Caplan, *et. al*, 1995; Rana, *et. al*, 1998; Chen, *et. al*, 2004),.

ENSAYO PARA CUANTIFICAR β-GALACTOSIDASA

Para confirmar y cuantificar la especificidad de la interacción de los plásmidos, se realizó un ensayo en cultivo líquido de β-galactosidasa utilizando como sustrato ONPG (o-nitrofenil β -D-galactopiranosida) en el cual se utilizó medio de cultivo SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/ con 100nM de flutamida y se hizo la comparación con cultivos sin flutamida.

ENSAYO EN CULTIVO LÍQUIDO

1. Poner un preinóculo en 5 mL de medio de cultivo, dejarlo a 30°C y en agitación (200 rpm) toda la noche.
2. Vortexear el tubo del cultivo por 0.5-1 min para dispersar las células, inmediatamente tomar 20 µL e inocular 5 mL de medio; incubar por 12 hrs a 30°C y en agitación (200 rpm), hasta que las células estén en fase logarítmica ($OD_{600} = 0.5-0.8$). Recordar la OD_{600} exacta cuando se cosechen las células.
3. Poner 1.5 mL de células en tres tubos de 1.5 mL. Centrifugar a 13 500 rpm por 30 seg y remover el sobrenadante cuidadosamente.
4. Adicionar 1.5 mL de buffer Z a cada tubo, vortexear hasta resuspender las células y nuevamente centrifugar y remover el sobrenadante.
5. Resuspender en 300 µL de buffer Z, poner los tubos en nitrógeno líquido por 1 min, inmediatamente después ponerlos en un baño a 37°C por otro minuto (repetir dos veces más el ciclo de congelar y descongelar)
6. Tomar 200 µL de cada tubo y ponerlos en un tubo nuevo, así como a un tubo ponerle la misma cantidad de buffer Z (blanco). Adicionarles 0.7 mL de buffer Z + β -mercaptoetanol
7. Empezar a contar el tiempo. Inmediatamente adicionar 160 µL de ONPG 4mg/ml en buffer Z a cada tubo de reacción y al blanco. Poner los tubos a incubar a 30°C en oscuridad.
8. Después que cambien a color amarillo, agregarles 0.4 mL de Na_2CO_3 1M a cada reacción y determinar el lapso de tiempo en minutos.
9. Se centrifugan los tubos por 10 min a 13000 rpm y cuidadosamente se transfiere el sobrenadante a placas de 96 pozos para leerlas al espectrofotómetro
10. El espectrofotómetro se calibra con el blanco a A_{420} y se miden las muestras a esta longitud de onda con respecto al blanco.

Por otro lado, de la lisis celular restante se determinó la proteína total de cada tubo utilizando el Kit de Bio-Rad “ensayo de proteína DC, basado en el método de Lowry. Para esto sólo se utilizan 10µL de muestra, se le agrega 200 µL de solución A y 10 µL de solución B, se deja incubando 15 minutos (esta reacción es estable por 1 hr y se lee a 750 nm.

Se calcularon las unidades de β-galactosidasa de la siguiente manera: una unidad Miller de β-galactosidasa se define como la cantidad de enzima que hidroliza un µmol de ONPG a σ nitrofenol y D-galactosa por minuto por miligramo de proteína y se calcula con la siguiente fórmula

Unidades de β-galactosidasa = $1000 \times OD_{420} / (t \times V \times \text{mg proteína})$

Donde t es el lapso de tiempo en minutos de incubación, V es el factor de dilución.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS E IDENTIFICACIÓN DE INSERTOS

Se aislaron los plásmidos que interactuaron con hAR de las levaduras. Primero se hicieron múltiples resiembras en medio SD-Leu para eliminar el plásmido pGBKT7-hAR. Posteriormente, se lisaron las células con un buffer de lisis. Con el sobrenadante se transformaron *E. coli* de la cepa DH5α, consecutivamente estas células se cultivaron en medio LB para después lisarlas y purificar los plásmidos.

Por medio de un miniprep de plásmidos de DNA por lisis alcalina se purificaron los plásmidos para verificar que las colonias habían adquirido los plásmidos presa, para determinar que tuvieran inserto, se digirieron con la endonucleasa HindIII debido a que corta en 4739 y 5497 flanqueando el sitio de múltiples clonaciones del plásmido vector pACT2-CWR ubicado de 4970 a 5089. Si el plásmido no tiene inserto se observa una banda de 758 pb y si tiene inserto se

esperan bandas de mayor tamaño o dos o más bandas en el mismo carril del mismo o menor tamaño (758 pb) debido a que pueden tener sitios de corte HindIII.

MINIPREP DE PLASMIDOS DE DNA POR LISIS ALCALINA (modificado de Ausubel, *et. al*, 1995).

1. Inocular 5 mL de medio LB estéril y con ampicilina 100 µg/mL con una colonia bacterial. Incubar el cultivo toda la noche a 37°C con agitación (usualmente 16 hrs.)
2. Poner 1.5 mL del cultivo en un micro tubo y centrifugar a 13000 rpm por 5 min a 4 °C, eliminar el sobrenadante y repetir este paso. Guardar el remanente del cultivo a 4°C.
3. Remover el medio por aspiración, dejando el botón bacteriano lo más seco posible.
4. Resuspender el botón bacteriano en 100 µL de la solución GTE fría y vortexear vigorosamente.
5. Agregar 200 µL de una solución NaOH 0.2 N y SDS 1%, preparada al momento, cerrar el tubo y mezclar por inversión 5 veces. No vortexear e incubar el tubo en hielo por 5 minutos.
6. Adicional 150 µL de acetato de potasio 5 M pH 4.8. Cerrar el tubo y vortexear en una posición invertida por 10 seg. Incubar el tubo en hielo por 5 min.
7. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a otro tubo. Repetir este paso.
8. Agregar 0.8 mL de etanol al 95% e incubar 30 min en hielo.
9. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min a 4°C.
10. Remover el sobrenadante, lavar el pellet con 0.5 mL de etanol al 70% y dejar secar el botón con el tubo invertido por 15 min.
11. Resuspender el botón en 30 µL de TE con 10 µg/ mL de RNasa. Incubar por 30 minutos a 37°C.

12. Determinar concentración espectrofotométricamente midiendo DO₂₆₀

Los plásmidos que tuvieron los insertos esperados se purificaron nuevamente, pero ahora con un kit de miniprep de laboratorios Qiagen Inc. EUA (siguiendo las especificaciones del fabricante) para obtener el DNA más puro.

MINIPREP PARA PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS QIAGEN

1. Por cada plásmido a purificar poner 1 tubo con 5 mL de medio LB e inocularlo con *E. coli* transformada. Incubarlos toda la noche a 37°C en agitación constante (200 rpm)
2. Cosechar las células centrifugándolas a 13000 rpm a 4°C por 5 min. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el botón bacteriano en 250 µL de buffer P1 con RNasa.
4. Adicionar 250 µL de buffer P2 y mezclar por inversión 4-6 veces. No vortexear.
5. Agregar 350 µL de buffer N3 y mezclar inmediatamente de 4-6 veces.
6. Centrifugar por 10 min. a 13 500 rpm a 4°C.
7. Pasar el sobrenadante a la columna de QIAprep utilizando una pipeta.
8. Centrifugar por 60 seg a 13 500 rpm. Eliminar el eluato.
9. Lavar la columna adicionando 0.75mL de buffer PE y centrifugar por 60 seg.
10. Eliminar nuevamente el eluato y centrifugar nuevamente 1 min para remover el buffer de lavado residual.
11. Pasar la columna a un tubo de 1.5 mL para eluir el DNA, adicionando 60 µL de buffer EB (Tris-Cl 10 mM, pH 8.5) en el centro de cada columna. Incubar por 1 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1 min.
12. Cuantificar el DNA y alicuotar 200ng en 40 µL de agua.

De estas muestras, nuevamente se digirieron los plásmidos para verificar que se encontraban los insertos y mandarlos a secuenciar (Laragen Inc. California, EUA). Finalmente las secuencias de nucleótidos se identificaron con la ayuda del programa BLAST en el GenBank.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASA

Para determinar la actividad específica de β -galactosidasa, se eligieron cuatro clonas de interacción con hAR. La primera se eligió porque se sabe que si interacciona con AR, la segunda porque es la que se observa con mayor inducción en los ensayos en cultivo líquido de β -galactosidasa y finalmente 2 posibles proteínas no caracterizadas que interactúan con AR. Para este ensayo, primero se debe obtener el extracto de proteína total de levaduras de la siguiente manera:

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNA TOTAL DE LEVADURAS

Poner un preinóculo en 5 mL de medio de cultivo SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/ con 100nM de flutamida, dejarlo a 30°C y en agitación (200 rpm) toda la noche. Vortexear el tubo del cultivo por 0.5-1 min para dispersar las células, inmediatamente tomar 1 mL e inocular 100 mL de medio; incubar por 3 hrs a 30°C y en agitación (200 rpm), hasta que las células estén en fase logarítmica ($OD_{600} = 0.5-0.8$). Recordar la OD_{600} exacta cuando se cosechen las células. Recuperar las células de los cultivos, centrifugar 5 min a 3000 rpm. Lavar 2 veces con H₂O bidestilada fría. Lavar con amortiguador de lavado y extracción + DTT 1 mM.

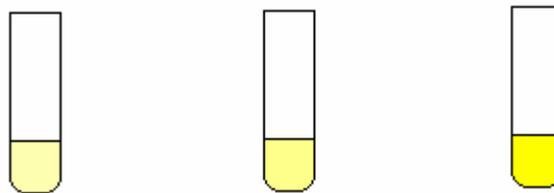
1. Resuspender los botones celulares en 600 μ L de buffer de lavado y extracción frío + DTT 1 mM.
2. Pasar la suspensión a tubos de 1.5 mL y agregar aproximadamente 1/3 de perlas de vidrio de 180 micrones frías.
3. Dar de 7-8 pulsos de vortex de 1 min.
4. Recuperar la suspensión de células y pasarlas a otro tubo de 1.5 mL.
5. Centrifugar a 13000 rpm por 20 min a 4°C

6. Recuperar la fase acuosa y ponerla en un tubo de 1.5 mL limpio. Si no se ocupa en el momento, guardar a -20°C .

Para hacer el ensayo de β -gal, se prepara un baño a 30°C . A temperatura ambiente, por cada muestra experimental se preparan 3 tubos con (900 μL de buffer Z + DTT 1mM) + (cantidad X de μL de buffer de lavado y extracción). La cantidad de buffer depende del volumen de muestra que se vaya a usar. Si se piensa utilizar un volumen de 10 μL de extracto, entonces se debe poner 90 μL de amortiguador de extracción. Para que se completen 100 μL entre los dos, y para que junto con el buffer Z los tubos tengan un volumen final de 1000 μL .

ENSAYO DE β -gal.

1. Una vez que los tres tubos estén listos y en el baño de temperatura se les agregan 200 μL de la solución de ONPG 4mg/mL y dar vortex.
2. Se deja transcurrir la reacción el tiempo necesario para que las muestras adquieran color amarillo. De preferencia color claro.
3. Cada uno de los tubos representa un tiempo distinto. Las reacciones se detienen con 100 μL de una solución de Na_2CO_3 1 M. Dar vortex.



Tubo 1: 10min

Tubo 2: 20 min

Tubo 3: 30 min

4. Se lee la D.O. De cada tubo a 420 nm.
5. Con los tres datos de D.O. y tiempos se hace una regresión lineal. Y con la pendiente que se obtiene se realizan los siguientes cálculos para obtener la actividad específica de β -gal.

actividad específica de β - gal= X_2^2/mg proteína total.

en donde: $(m)(1.7)= X_1$ y $X_1/\text{alícuota en mL} = X_2$

La actividad específica de una proteína, como en este caso de β -galactosidasa se define como: $(\mu\text{mol de sustrato o producto})/(\text{minuto})(\text{mg proteína total})$ (Leninger, 1984).

RESULTADOS

SUBCLONACIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS HUMANO

Se clonó al receptor de andrógenos humano completo (2 757 pb) en el plásmido de expresión en levaduras pGBKT7 (figura 10), que tiene el dominio de unión a DNA de GAL4, los fragmentos se obtuvieron a partir de 2 plásmidos, el primero VP-ABC, que incluye los aminoácidos 1-564 de hAR (1 692 pb), y el segundo pCMV-hAR, que contiene al receptor completo se utilizó para obtener el fragmento de aminoácidos 564-919 (1 065 pb). Lo que constituye una ligación triple

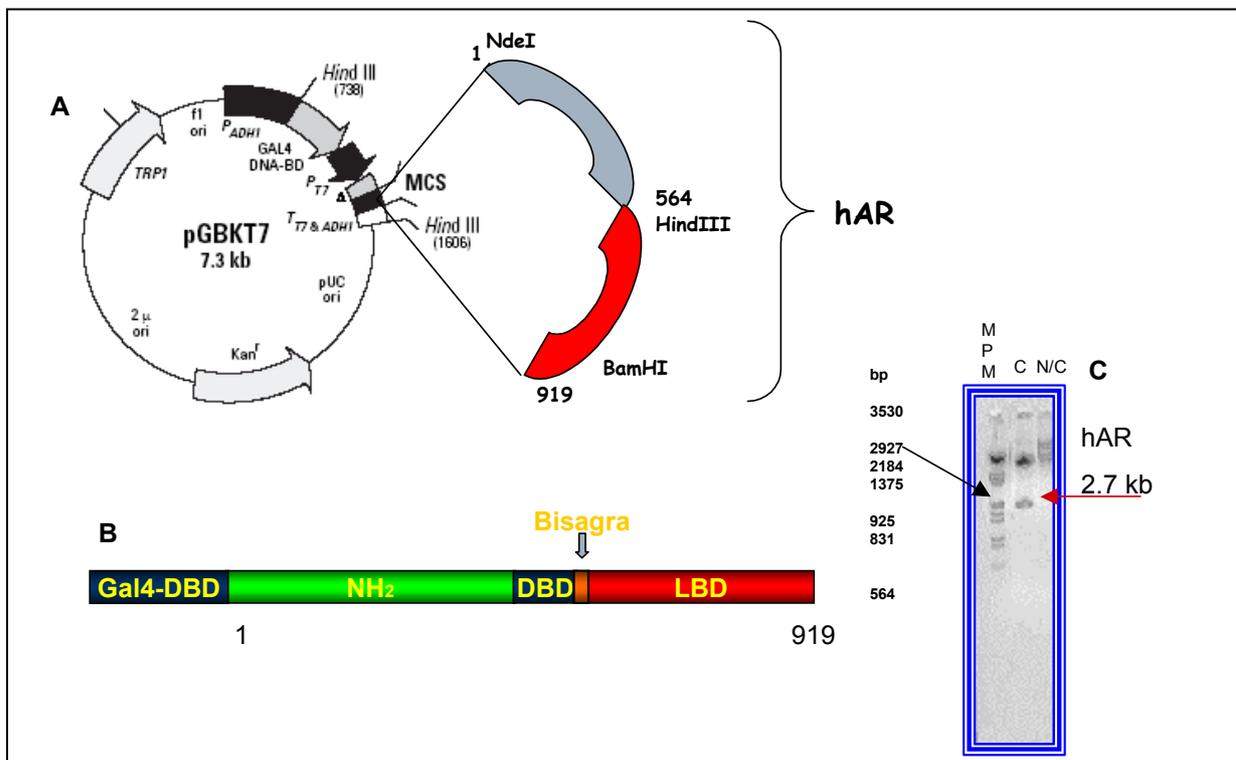


Figura 10.- Clonación del receptor de andrógenos humano. En A se muestra el vector de clonación con los fragmentos de AR humano obtenidos de otros plásmidos, en B la construcción esquemática de la proteína de fusión GAL4-DBD y hAR completo. C se observa en un gel de agarosa al 1%. La flecha roja indica una banda del peso molecular de hAR completo digerido a partir del plásmido pGBKT7-hAR con las endonucleasa *NdeI* y *BamHI*. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (MPM), en el segundo el plásmido digerido (C) y en el tercero sin digerir (N/C).

Se sugiere que las ligaciones se hagan a 16°C y se dejen incubando toda la noche para evitar que se degrade la ligasa, sin embargo, como se trataba de una ligación triple, no se sabía cual era la temperatura óptima, por lo que se probaron tres (4°C, 16°C y temperatura ambiente), de cada reacción. Se tomaron 5µL de muestra para transformar bacterias y con esto obtener el plásmido con hAR clonado. La ligación a temperatura ambiente fue la más eficiente seguida de la de 4°C y contrario a lo que se esperaba, a 16°C no se observó ligación.

De 20 colonias bacterianas 14 tenían el plásmido clonado, se eligió una para purificar el plásmido por medio del kit de Qiagen y se mandó a secuenciar. Posteriormente, se alineó con la secuencia de hAR para verificar que estuviera bien clonado, en marco abierto de lectura con GAL4 y no tuviera mutaciones. Por último el plásmido se purificó por CsCl, debido a que por esta técnica queda más puro para poderlo utilizar en el ensayo de doble híbrido.

SISTEMA DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

Se implementó el sistema "Matchmaker two-hybrid system 3" de Clontech Laboratories, Inc., siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó como carnada el hAR activado con flutamida y se tamizó una genoteca de cáncer de próstata recurrente (CWR-R1). Esta genoteca se construyó a partir de RNAm obtenido de un xenoinjerto de cáncer de próstata recurrente obtenido de un paciente y crecido en ratones atómicos. Los cDNAs se clonaron en un vector que tiene el dominio de transactivación de GAL4 (pACT2).

Cuando la carnada y la proteína de fusión de la genoteca interactúan, la región de unión a DNA de GAL4 y la región de activación del mismo se acercan, completando la terna y así se activa la transcripción de los 4 genes reporteros (*Adenina 2*, *Histidina3*, *MEL1* o *lacZ*) bajo el control de distintas secuencias de activación corriente arriba y cajas TATA. Estos promotores permiten respuestas

fuerzas y específicas para GAL4. Esta tecnología es utilizada para identificar nuevas interacciones entre proteínas.

Se realizó una transformación inicial con pGBKT7-hAR utilizando la cepa de levaduras AH109 como células hospederas para determinar que no activa de manera autónoma los genes reporteros y que la construcción no es tóxica para las células hospederas. Subsiguientemente se hizo una cotransformación de la carnada y la genoteca a pequeña escala, debido a que en el laboratorio no se tenía la experiencia de utilizar este sistema.

Las transformantes fueron seleccionadas en medio Sabouraud Dextrose (SD) – Leu/-Trp/ X- α -Gal y con 100nM de Flutamida (se utilizó esta concentración de flutamida, porque en estudios previos hicieron una curva dosis-respuesta para la actividad de β -galactosidasa [Gaido, *et. al*, 1997; Moilanen, *et. al*, 1997]), con esto solo se asegura que se encuentran los dos plásmidos dentro de una célula hospedera y se pone azul.

Se obtuvieron aproximadamente 1000 colonias, de las cuales 123 activaron con x-gal al tornarse de color azul. Posteriormente, estas 123 se sembraron en medio SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/X- α -Gal en presencia de 5 y 10 μ M de 3-4 amino triazol (es un inhibidor competitivo de la proteína His3p, utilizado para inhibir los bajos niveles de expresión de esta proteína) y sólo se observó el color azul en 92 colonias, lo cual indica que expresaron los cuatro genes reporteros. Consecutivamente, se hicieron múltiples resiembras, para garantizar que en cada colonia solo tuviera un plásmido de la genoteca y uno expresando hAR

Se realizó otro tamizado utilizando X-gal en lugar de X- α -Gal debido a que es menos sensible, esto se hizo para obtener sólo aquellas colonias cuya interacción era más fuerte y que indujeran mayor activación de *lacZ*. Además se repitió el experimento en presencia de los antiandrógenos flutamida,

casodex y acetato de ciproterona [100nM]. En total activaron 43 colonias, de las cuales 25 activaron con flutamida (posiblemente ya no se observó la activación de *lacZ* en el resto de las colonias por la sensibilidad del reactivo), 30 con acetato de ciproterona y 23 con casodex; coincidiendo en la activación en presencia de los tres antiandrógenos, 16 colonias como se observa en la figura 11. En ausencia de antiandrógenos no se observa activación de *lasZ*.

TAMIZADO CON X-GAL Y LOS 3 ANTIANDRÓGENOS

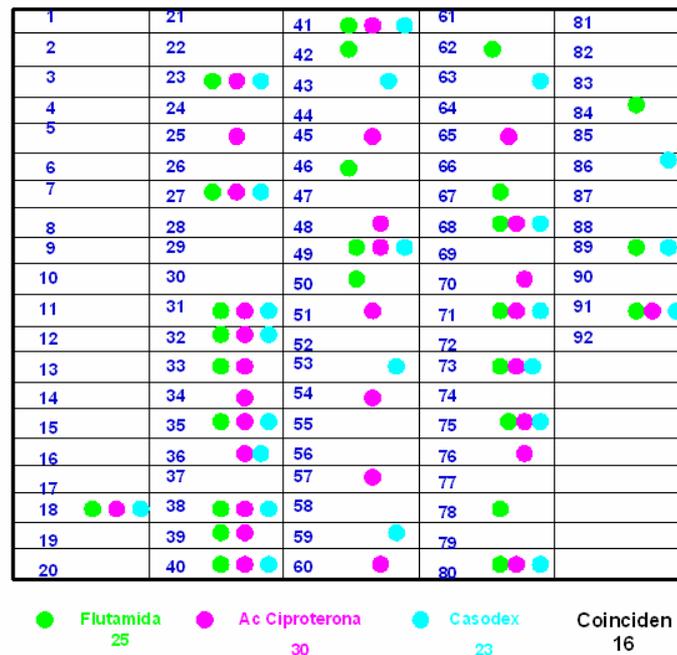


Figura 11.- En este cuadro se presenta en resumen cuales colonias activaron con cada uno de los antiandrógenos y se observa que 16 coinciden en su activación con las tres antihormonas.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Para purificar y verificar que el plásmido de las clonas positivas tuvieran inserto, se hicieron múltiples resiembras de las mismas en medio SD-Leu para eliminar el plásmido carnada. Posteriormente, se lisaron las levaduras y los plásmidos se transformaron en *E. coli* en presencia de ampicilina para garantizar que solo se tuviera el plásmido de la genoteca, porque solo este plásmido tiene el gen de resistencia a ampicilina. Los plásmidos se purificaron por medio de miniprep de plásmidos de DNA por lisis alcalina y se digirieron con Hind III (se esperaban bandas arriba de 758 pb, como se explicó anteriormente).

De los plásmidos de las 43 clonas, se obtuvieron 26 con fragmentos arriba de 758 pb, de las cuales 7 activan con los tres antiandrógenos, 2 con dos antiandrógenos (una con flutamida/acetato de ciproterona y la otra con acetato de ciproterona/bicalutamida), 6 con flutamida, 10 con acetato de ciproterona y 1 con casodex.

En la figura 12, se muestran los plásmidos obtenidos sin digerir y digeridos con HindIII en geles de agarosa al 1.5%, en A se encuentran las activaciones triples, es decir las que activan con los tres antiandrógenos (1-7) y las que activan con dos antiandrógenos (8 y 9). En B los plásmidos que activan solo con flutamida (10-16) y en C los que activan con acetato de ciproterona (17-26). pAC2 es el vector pACT2 de los cDNAs de la genoteca CWR-R1. Los nombres completos de las secuencias se pueden ver en la tabla 1 de acuerdo con el número.

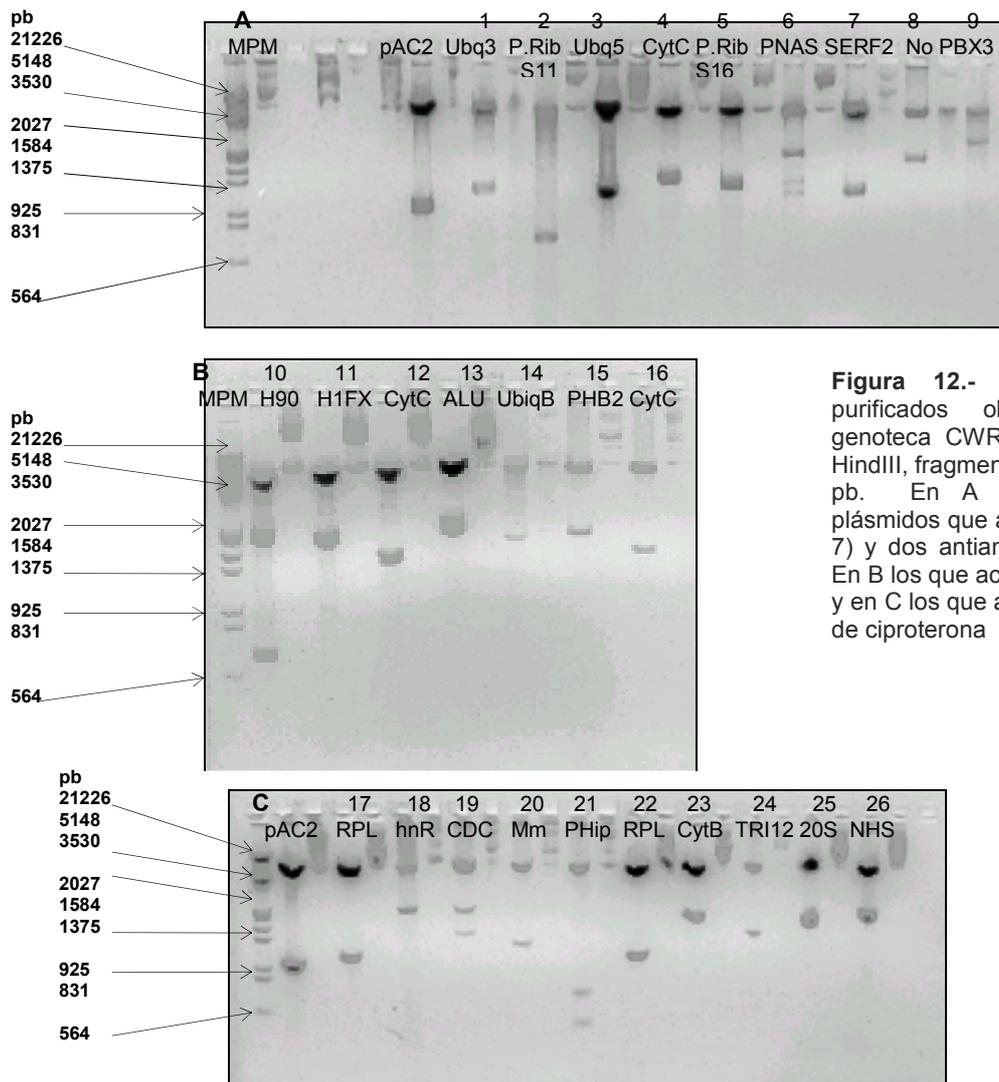


Figura 12.- Plásmidos presa purificados obtenidos de la genoteca CWR-R1 cortados con HindIII, fragmentos mayores a 800 pb. En A se muestran los plásmidos que activan con tres (1-7) y dos antiandrógenos (8 y 9). En B los que activan con flutamida y en C los que activan con acetato de ciproterona

ENSAYO EN CULTIVO LÍQUIDO DE β -GALACTOSIDASA

Se realizó el ensayo en cultivo líquido por triplicado, de las 26 clonas de los plásmidos que tuvieron inserto, para verificar y cuantificar la actividad de β -galactosidasa de las interacciones proteína-proteína del doble híbrido en levaduras, utilizando como sustrato ONPG. Se comparó la intensidad relativa de la interacción proteína-proteína observada en ausencia y en presencia de 100 nM de flutamida de las clonas que activan con las tres antihormonas,

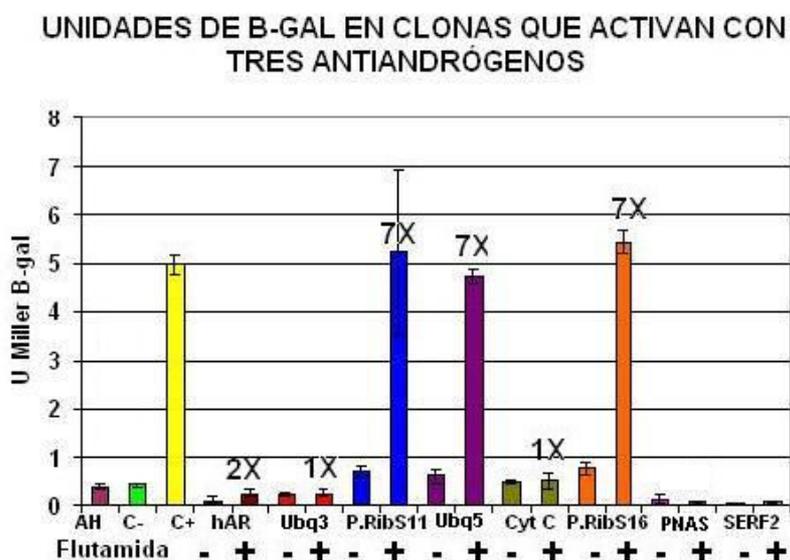


Figura 13 .- Unidades de β -galactosidasa producida de las interacciones que activaron con tres antiandrógenos, la inducción se hace con 100nM flutamida, AH son células de la cepa AH109 sin plásmidos, C- y C+ son los controles negativo(hAR+Laminina [no interactúa con el receptor]) y positivo (hAR+ p53 [un activador de hAR])respectivamente, hAR es AH109 sólo con hAR, en seguida se muestran las interacciones de hAR con diferentes proteínas de la genoteca CWR-R1 en presencia (+) o ausencia (-) de flutamida.

Como se puede observar en estas clonas (figura 13), tres de las seis interacciones activan siete veces más en presencia de flutamida que en ausencia y además con la misma magnitud que el control positivo (hAR con p53 un activador transcripcional), estas son entre hAR y proteína ribosomal S11 (P.RibS11), ubiquinona 1 α subcomplejo 5 (Ubq5) ó proteína ribosomal 16S (P.RibS16). En lo que respecta con ubiquinona 1 α subcomplejo 3 (Ubq3), citocromo C oxidasa (Cyt C), proteína relacionada con la

diferenciación/apoptosis (PNAS) y secuencia EDRK rica en factor 2 (SERF2), no se observa una diferencia en activación en presencia o ausencia del antiandrógeno.

En las clonas que activan con dos antiandrógenos, se hizo la inducción con acetato de ciproterona debido a que las dos activaron con el mismo, puesto que la primera activa con flutamida/acetato de ciproterona y la segunda con acetato de ciproterona/bicalutamida, como se puede apreciar en la figura 14, en la primera no hay inducción significativa y en factor de transcripción 3 (PBX3) en presencia de acetato de ciproterona aumenta 4.2 veces, sin embargo es más baja que el control positivo.

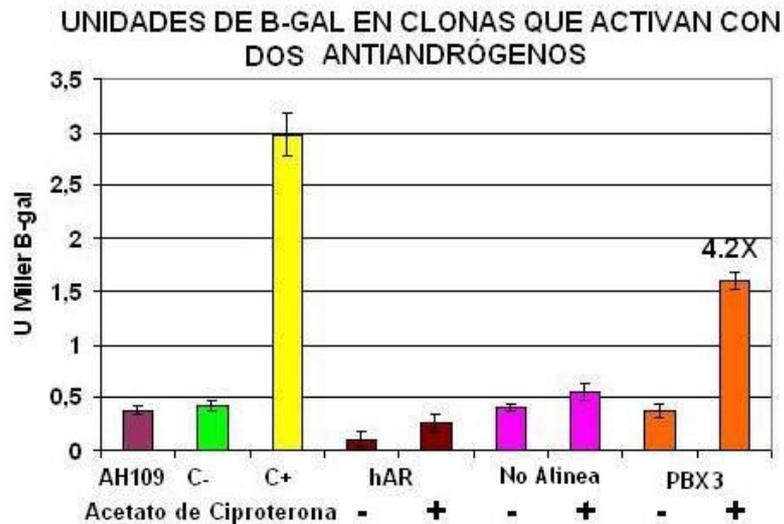


Figura 14.- Unidades de β -galactosidasa producida de las interacciones inducidas con dos antiandrógenos, la inducción se hizo con acetato de ciproterona. AH son células de la cepa AH109 sin plásmidos, C- y C+ son los controles negativo y positivo respectivamente, hAR es AH109 sólo con pGBKT7-hAR, en seguida se muestran las interacciones de hAR con las 2 proteína de la genoteca CWR-R1 que se encontraron en presencia (+) o ausencia (-) de acetato de ciproterona.

En el caso de Cyt C en presencia de bicalutamoda o casodex no se observa interacción significativa, así como en ubiquitina b (UbiqB) y prohibitina 2 (PHB2) que activaron con flutamida; el miembro X de la familia de la histona H1 (H1FX) y Cyt C activan tanto con flutamida como sin ella, indicando una fuerte interacción proteína-proteína, quizás independiente de ligando y HSP90 activa solo en presencia del antiandrógeno al igual que el ALU (figura 15).

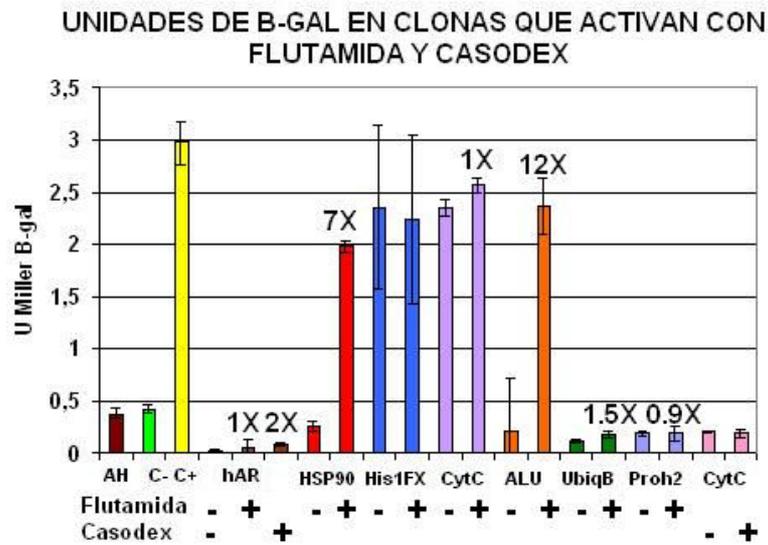


Figura 15.- Unidades de β -galactosidasa producidas con la inducción de flutamida y casodex

En cuanto a las interacciones que activan con acetato de ciproterona todas activan con mayor magnitud en presencia del antiandrógeno, sin embargo, con la proteína ribosomal L3 (RPL3P4), proteína 12 que interactúa con el receptor de hormona tiroidea (TRI12) y el transcrito variante 7 parecido a NHS1 (NHSL1) no es tan significativo el cambio en la inducción en presencia o ausencia del antiandrógeno, como se puede apreciar en la figura 16.

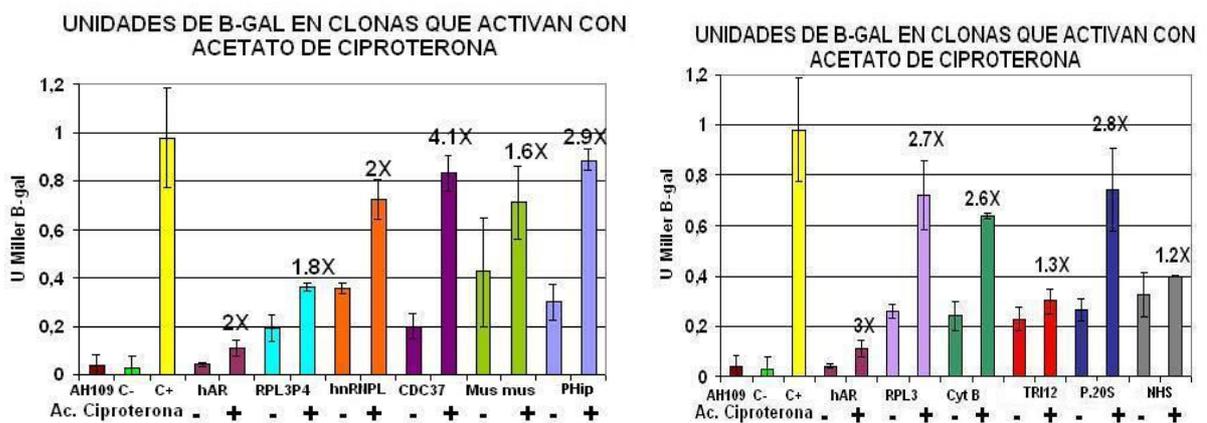


Figura 16.- Unidades de β -galactosidasa de las interacciones que activaron con acetato de ciproterona

IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE INTERACTUARON CON hAR

Los plásmidos nuevamente se purificaron pero ahora por columnas, debido a que deben tener una pureza más elevada para poder secuenciarlos, después con las secuencias y con ayuda del programa BLAST se identificaron los 26 cDNAs obtenidos en el GenBank las alineaciones se muestran en anexo y el resumen en la tabla 1.

Tabla 1.- Las secuencias identificadas se ordenaron de acuerdo a su activación por los antiandrógenos, se da el nombre, descripción, identidad entre la secuencia obtenida de la genoteca y la secuencia del GenBank y las veces de inducción con el antiandrógeno en los ensayos de ONPG.

NOMBRE Y N° GenBank	DESCRIPCIÓN	IDENTIDAD	INDUCCIÓN β -GAL
Activan con 3 antiandrógenos			
1. Ubiquinona 1 α subcomplejo 3	Nueva proteína similar a NADH deshidrogenasa 9kDa (NDUFA3)	99%	1X
2. Proteína Ribosomal S11 gi 11225779 emb AL359708.8	Se tiene el CDS completo	99%	7X
3. Ubiquinona 1 α subcomplejo 5 gi 13699821 ref NM 005000.2	NADH deshidrogenasa de 13 kD	100%	7X
4. Citocromo C oxidasa subunidad II. gi 57904248 gb AY882415.1	Proteína mitocondrial	100%	1X
5. Proteína ribosomal 16S RNR2. gi 32894297 gb AY339544.1	Forma parte del RNA ribosomal 16S	99%	7X
6. PNAS 119. gi 12751084 gb AF277177.1 AF277177	Proteína relacionada con la diferenciación/ apoptosis NB4	97%	No se observa
7. SERF2. gi 14198304 gb BC008214.1	Secuencia EDRK rica en Factor 2	100%	No se observa
Activan con 2 antiandrógenos			

8. No alínea Flu/Cyp			1X
9.PBX3 Cyp/Cas. gi 16877461 gb BC016977.1	Factor de transcripción 3 de células de leucemia	99%	4.2X
Activan con flutamida			
10. HSP90. gi 40254815 ref NM_005348.2	Proteína de shock térmico de 90kD. Interactúa con AR en citoplasma sirviéndole como chaperona	98%	7X
11. H1FX. gi 20336759 ref NM_006026.2	Miembro X de la familia de la histona H1.	98%	1X
12. Citocromo C oxidasa subunidad II. gi 57904248 gb AY882415.1	Proteína mitocondrial	99%	1X
13. ALU	Secuencia repetitiva transcrita, con potencial para crear exones alternativos y resultan en artificios	100%	12X
14. Ubiquitina B. gi 24660326 gb BC038999.1	Involucrada en la degradación y regulación de proteínas.	97%	1.5X
15. PHB2. gi 15928585 gb BC014766.1	Prohibitina 2, proteína de 37kD que recluta HDAC1, además se ha descrito con actividad de represor del Receptor de Estrógenos (ER) (Bacher et al, 2002)	100%	0.9X
Activan con Casodex			
16. Citocromo C oxidasa subunidad II. gi 57904248 gb AY882415.1	Proteína mitocondrial	100%	0.9X
Activan con Acetato de Ciproterona			
17. RPL3P4. gi 29789539 ref NG_002559.1	Proteína ribosomal L3	100%	1.8X
18.-hnRNP L. gi 52632384 ref NM_001005335.1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea L involucrada en el reconocimiento de proteínas y unión de nucleótidos	90%	2X
19.-CDC37. gi 38014177 gb BC000083.2	Proteína que interactúa en citoplasma con AR en el LBD en presencia de hormona (Rao, et al, 2001)	96%	4.1X

20. Mus Musculus gi 55583479 gb AC122159.30	Proteína que se alinea al genoma del ratón <i>Mus musculus</i>	99%	1.6X
21. mgc23909. gi 22382064 gb BC028585.1	Proteína hipotética con un sitio de N-glicosilación y su gen se encuentra en el cromosoma 5 de <i>Homo sapiens</i> . Función desconocida	100%	2.9X
22. RPL3. gi 56972439 gb BC088373.1	Proteína ribosomal L3. No se encontraron dominios característicos	100%	2.7X
23. Citocromo b. gi 48596223 gb AY195792.2	Proteína mitocondrial	100%	2.6X
24. TRIP12. gi 10863902 ref NM_004238.1	Proteína 12 que interactúa con el receptor de hormona tiroidea (Strausberg, et al, 2002).	97%	1.3X
25. Subunidad C2 del proteosoma 20S gi 8894666 emb AJ272019.1 M MU27201	Pertenece al centro catalítico del proteosoma 20S	100%	2.8X
26. NHSL1. gi 88999371 ref XM_945448.1	Transcrito variante 7 parecido a NHS1. Función desconocida	98%	1.2X

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASA

Finalmente se determinó la actividad específica de β -galactosidasa debido a que como su nombre lo dice, se puede determinar la interacción proteína-proteína más específicamente porque a diferencia del ensayo de cuantificación de β -galactosidasa, se mide la actividad de la enzima a diferentes tiempos asegurando una medición más exacta.

Se eligieron cuatro clonas de interacción con hAR. HSP90 se eligió porque se sabe que si interacciona con AR, ubiquinona 1 α subcomplejo 5 (Udq5) porque es la que se observa con mayor inducción en los ensayos en cultivo líquido de

β -galactosidasa y finalmente SERF2 y Prohibitina 2, por ser proteínas no caracterizadas que interactúan con AR.

En la figura 17, podemos observar la inducción en la actividad de β -galactosidasa de las interacciones con hAR, con o sin flutamida, como se puede ver en presencia de flutamida solo se ve una inducción significativa con HSP90, esto podría deberse a que como se sabe, esta proteína interactúa con hAR en ausencia de ligando y es posible que la acción de la flutamida no sea suficiente para desplazar la interacción con esta chaperona.

Sin embargo, como se puede apreciar en la gráfica, existe una disminución en la actividad en presencia de flutamida en las interacciones de hAR con Ubq5, SERF2 y prohibitina 2. En lo que se refiere a prohibitina 2, esta disminución puede deberse a que esté actuando como represor transcripcional con en el caso del ER (Martín y Katzenellenbogen, 2003; Mishra, *et. al*, 2005;) y en cuanto a las otras proteínas es posible que excitan interacciones en ausencia de hormona (lo cual ya se sabe con HSP90) bajo este experimento más sensible.

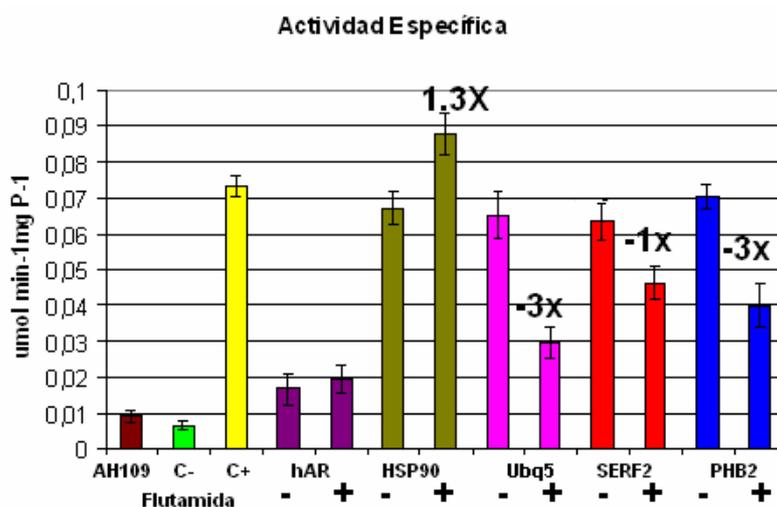


Figura 14.- Actividad específica de β -galactosidasa de cuatro interacciones hAR-HSP90/Ubq5/SERF2/Prohibitina2. AH (AH109 sin plásmido), C- levaduras con pGADT7-T y pGBKT7-Lam control negativo de la interacción), C+ (levaduras con pGADT7-T y pGBKT7-53 control positivo de la interacción), hAR (levaduras con solo pGBKT7-hAR). La inducción se hizo con 100nm de flutamida.

DISCUSIÓN

La importancia de los andrógenos en el desarrollo del cáncer de próstata se ha conocido desde hace medio siglo, cuando la castración del individuo era la terapia recomendada. Adicionalmente, se ha sugerido que los polimorfismos del AR, especialmente el relacionado con el número de repeticiones de glutamina en el exón 1 del gen, están asociados con el riesgo de CaP (Gsur, et al, 2002).

Sin embargo, no todos los estudios han confirmado esta asociación. Ahora es claro que carcinomas prostáticos emergen de manera dependiente de andrógenos y que sorprendentemente, durante la terapia de privación de andrógenos, pueden resurgir como tumores hormono-refractarios y son capaces de reactivar la señalización mediada por AR a pesar de los bajos niveles de andrógenos.

Una tercera parte de los carcinomas hormono-refractarios de próstata tienen amplificación del gen de AR (Zhang, 2003) y además, del 10 al 30% de estos carcinomas tratados por antiandrógenos adquieren puntos de mutación en el gen de este receptor. Así mismo, diferentes grupos han visto la expresión de genes andrógeno regulados en cáncer hormona-refractario. Además, se ha mostrado que la interrupción de la traducción de AR en el ribosoma o por la inhibición mediada por oligonucleótidos antisentido en líneas celulares de cáncer de próstata refractario señalan una implicación directa del AR en esta enfermedad (Háág et al, 2005; Culing, et al 2004). Todos estos datos sugieren fuertemente que el receptor de andrógenos podría ser considerado como blanco de tratamiento para este tipo de cáncer.

En contraparte, uno de los mayores problemas del tratamiento con antagonistas es la resistencia del cáncer a la terapia, la cual está asociada con la pérdida de la inhibición del AR. Una de las explicaciones moleculares es que

hay una menor expresión de correpresores ó que han perdido la habilidad para reprimir al AR, y posiblemente activan vías de señalización alternas (Liang-Nian, *et. al*, 2004).

Se ha observado, que la expresión de algunos coactivadores incrementa después de la privación de andrógenos en células de cáncer de próstata, esto podría ayudar a estas células a adaptarse a ambientes con baja concentración de andrógenos. En varios estudios, hay evidencias de que las propiedades antagonistas de los antiandrógenos se reducen sustancialmente cuando un coactivador se sobreexpresa o cuando bajan la concentraciones de un correpresor. (Culing, *et. al* 2004).

Aunque muchos coactivadores de AR han sido identificados, pocos correpresores se han encontrado y caracterizado; la mayoría de estos correguladores se han encontrado utilizando el sistema doble híbrido en levaduras.

El sistema doble híbrido en levaduras se ha utilizado ampliamente para identificar interacciones proteína-proteína y nos proporciona información adicional de ORFs en un contexto biológico, con el objeto de entender sus funciones (Uetz, *et al*, 2000). Este sistema es sensible y flexible para ser comprobado con otros métodos. Generalmente se tamizan genotecas de cDNA para encontrar proteínas no caracterizadas. Los resultados obtenidos con este sistema demuestran que se pueden encontrar un número significativo de vías de señalización y/o complejos que aún no se han descubierto (Uetz, *et al*, 2000).

Desde la década de los 90s, han establecido varios sistemas de doble híbrido en levaduras para detectar cuantitativamente la interacción directa ligando (agonista)-receptor nucleare y correguladores (Chen, *et al*. 2004), sin embargo, con ligandos antagonistas aún no ha sido evaluado, por lo que en esta investigación se tamizó una genoteca de cáncer de próstata recurrente (CWR-R1) que expresa a hAR y es estable en ausencia de andrógenos (Gregory *et. al*, 2001) en presencia de flutamida, que es un antagonista del hAR.

Por otro lado, Rana y colaboradores en 1998, determinaron que *Saccharomyces cerevisiae* es sensible para tamizar efectivamente genotecas utilizando al AR como carnada, con lo cual demuestran que la actividad de β -galactosidasa es estrictamente dependiente de la presencia de T y DHT, en contraste, los antiandrógenos CPA y flutaida no inducen la actividad del reportero. Sin embargo, en nuestro modelo de estudio observamos la presencia de actividad de β -galactosidasa en presencia de antagonistas, esto sugiere que posiblemente existe un mecanismo diferente de activación del receptor signifique en cancer de próstata recurrente.

Por otro lado, en el presente trabajo pudimos identificar proteínas de diferentes compartimentos celulares incluyendo núcleo, citoplasma, ribosoma y mitocondria. No todas las secuencias han sido reportadas previamente y algunas que se encuentran en marco abierto de lectura son denominadas proteínas hipotéticas. También aislaron secuencias no codificantes. (Ver tabla 2)

Tabla 2.- Proteínas identificadas por BLAST y ordenadas de acuerdo a Compartimentos celulares.

<p>Nucleares</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. H1FX, Miembro x de la familia de las histonas 1 2. Ubiquitina B 3. Subunidad C2 del proteosoma 20S 4. PHB2, Prohibitina 2 5. hnRNPL, Ribonucleoproteína nuclear heterogénea L 6. TRI12, Proteína 12 que interactúa con el receptor de hormona tiroidea 7. PBX3 Factor de transcripción 3
<p>Citoplásmicas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. HSP90, Proteína de choque térmico 90 2. CDC37
<p>Ribosomales</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Proteína ribosomal S11 2. RNR2, Forma parte del RNA ribosomal S16 3. RPL3P4, Pseudogen de la proteína ribosomal L3

4. RPL3, Proteína ribosomal L3
Mitocondriales
<ol style="list-style-type: none"> 1. Ubiquinona 1 alfa subcomplejo 3 (NADH) 2. Ubiquinona 1 alfa subcomplejo 5 (NADH) 3. Citocromo C oxidasa subunidad II (3 veces) 4. Citocromo B
No descritas
<ol style="list-style-type: none"> 1. Proteína relacionada con la diferenciación/apoptosis NB4 2. Transcrito variante 7 parecido a NHSL1 3. mgc 23909 Proteína hipotética con sitio para N-glicosilación 4. SERF2, secuencia EDRK rica en factor 2. 5. secuencia no descrita que puede ser ortóloga con alguna de <i>Mus musculus</i>
No codificantes
<ol style="list-style-type: none"> 1. ALU 2. No alinea.

Las proteínas nucleares encontradas fueron: 1) H1FX, miembro X de la familia de las histonas 1, esta familia de proteínas son ricas en residuos de lisina. En ausencia de H1, el nucleosoma se comprime a ~146 pb de DNA por 1.75 vueltas. En presencia de H1, el cromosoma contiene dos vueltas completas de 168 pb. La proporción de H1 es 1:1 con respecto al número de nucleosomas. Se han descubierto siete variantes de la histona H1. Hay estudios que revelan la asociación entre subtipos de H1 en el crecimiento y diferenciación celular (Jason et al.,2005).

Se sabe que la sobreexpresión de la histona H1 puede disminuir la progresión del ciclo celular y reprimir la expresión de genes, además han mostrado que este subtipo de histona y la RNA polimerasa II comparten un epítipo antigénico común, sugiriendo que pueden competir en regiones similares de la cromatina (Th'ng et al., 2005). Por lo tanto, esta proteína puede estar actuando como un represor transcripcional.

Bouterfa et al., en 1995, demostraron que los niveles de expresión de un subtipo de H1 correlacionan inversamente con la proliferación celular y sus

datos sugieren que varios receptores nucleares incluyendo a AR pueden influir en la proliferación celular vía regulación de la expresión de este subtipo de H1.

2) Ubiquitina B, esta involucrada en la degradación de proteínas regulatorias, anormales o mutadas (Ciechanover, 1998). Así mismo existen evidencias de que la conjugación de NRs con la ubiquitina está involucrada con la transcripción dependiente de los mismos, en el caso específico de AR, se sabe que es blanco del proteosoma 26S en ausencia de ligando, sin embargo, incrementa su estabilidad al estar unido a su ligando (Dennis, 2005). La degradación mediada por ubiquitinas de proteínas regulatorias es crítica en varios procesos celulares tales como progresión del ciclo celular, transducción de señales, regulación transcripcional y endocitosis.

Además, la ubiquitinación actúa como señal para el tráfico de proteínas, activación de factores transcripcionales y otros procesos no proteolíticos (Hicke 2001, Pickart 2001, Weissman 2001). Algunos estudios han sugerido que la vía ubiquitinación-proteosoma está involucrada en la activación de genes mediada por receptores nucleares (Nawaz et. al. 1999). Mientras que al inhibir el proteosoma aumentas los niveles de AR en células LNCaP y HepG2 (Sheflin et al, 2000). Así mismo, coactivadores tales como SRC-1, TIF2, GRIP1 y CBP también son blanco del sistema ubiquitina-proteosoma. Varias ubiquitinas han sido identificados como proteínas que interactúan con receptores nucleares (Lonard 2000, Baumann et al 2001).

Por otra parte, se ha demostrado que Ubiquitina C interactúa con AR y aumenta la transactivación dependiente del mismo (Poukka et al, 1999), por lo que ubiquitina B también podría interactuar con este receptor, debido a que las ubiquitinas comparten ciertos dominios de interacción entre el que esta el dominio de interacción con AR. Por otra parte, algunos miembros de la familia de ubiquitinas pueden actuar como coactivadores de varios miembros de la superfamilia de receptores nucleares (Beitel et al 2002). La ubiquitinación de receptores nucleares y sus correguladores pueden determinar el destino y

función de estas proteínas, sin embargo, los mecanismos moleculares y factores que forman estas modificaciones no han sido bien caracterizados, por lo que se sugiere que la ubiquitina puede estar participando en alguno de estos procesos.

3) Subunidad C2 del proteosoma 20S, es el centro catalítico del complejo proteosomal 26S responsable de la degradación de proteínas dependiente de ATP de sustratos ubiquitinados. Con un peso molecular de aproximadamente 750 kDa. El complejo proteosomal 20S de eucariotes está compuesto de por lo menos 14 subunidades con diferente carga y estas subunidades están divididas en dos categorías α y β , con base en la similitud de sus secuencias (Huang y Burlingame, 2005). La subunidad que se aisló en este doble híbrido pertenece a la primer categoría y es denominada $\alpha 6(C2)$. Existen por lo menos dos diferentes vías que llevan a la activación del proteosoma 20S de eucariotes. Una involucra la unión al complejo proteosomal 19S para formar el proteosoma 26S y la otra implica la unión de una proteína activadora llamada PA28, cada una de estas vías permite la activación del proteosoma 20S. El proteosoma 26S es responsable de la degradación de proteínas ubiquitinadas y es dependiente de ATP, este proteosoma se ha identificado en todos los eucariotes (Nawaz et. al. 1999).

Beitel y colaboradores (2002) utilizaron la región NH_2 terminal, que contenía repeticiones poliGln para aislar ARNIP una ubiquitin ligasa, y la longitud de esta región de poliglutaminas esta inversamente asociada con el riesgo al CaP (Irvine, et al 2000).

Se tiene la hipótesis que las proteínas que tienen un tracto de poliglutaminas como el AR pueden ser resistentes a la degradación, previenen el reciclamiento de la ubiquitina e interrumpen la función del proteosoma. La vía ubiquitina-proteosoma es esencial para la degradación rápida de muchas proteínas regulatorias críticas y su interrupción es fatal para la célula (Wyttenbach, et. al, 2000). En CaP la reducción de poliQ en AR es la que parece estar involucrada

en esta enfermedad, por lo tanto, es más difícilmente que se le una la ubiquitina y esto aumenta la vida media del AR.

3) Prohibitina 2 (PHB2), también conocida como prohibitona, es un represor de la actividad del receptor de estrógenos (REA) o proteína 37 asociada con el receptor de células B (BAP 37)(Terashima, et al, 1994; Bacher et al, 2002; Nijmans, et al, 2002; Mishra, et al, 2005). Tiene una masa molecular de 37 kDa y su función biológica es poco entendida. Es una proteína conservada evolutivamente, ya que se ha encontrado desde cianobacterias hasta células de mamíferos. Fue nombrada prohibitina por su habilidad de inhibir la proliferación celular. Su localización nuclear ha sido reportada en líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y de seno, en estas últimas colocaliza con E2F1 y p53 (Mishra, et al, 2005). Se ha demostrado que PHB y PHB2 forman complejos heterotetraméricos entre ellas y además con otras proteínas y estos complejos son importantes para la estabilidad de ambas proteínas (Bacher, et al, 2002).

El reclutamiento de prohibitina a promotores induce la represión transcripcional dependiente de desacetilasas de histonas 1 y se ha visto que también media represión ejercida por N-CoR en promotores regulados por PHB (Wang, et al, 2002; Luguó, 2004). Además, se ha demostrado que PHB2 interactúa con el receptor de estrógenos (ER) y reprime su actividad transcripcional (Delage-Mourroux, 2000) porque compete con la unión de SRC-1 vía el motivo LXXLL en su NH₂ terminal (Lin, et al, 2003). ER es miembro de la familia de SHRs como AR. Sin embargo, no se ha demostrado previamente una interacción con AR.

Se conocen más datos sobre el funcionamiento de PHB que de PHB2. Se ha encontrado que prohibitina es regulada por andrógenos, además, en la línea celular de cáncer de próstata PC3, transfectada con AR silvestre, demostraron una disminución dependiente de andrógenos de PHB de alrededor del 30 % en presencia de 100nM de DHT. Al parecer, PHB es un importante blanco de andrógenos en células epiteliales de próstata debido a que regula a nivel

transcripcional y media la señalización de andrógenos en el ciclo celular. La localización nuclear y efecto inhibitorio de PHB en el crecimiento estimulado por DHT indica que PHB juega un papel importante en la represión del crecimiento en células sin estímulo. Este efecto, al parecer esta relacionado específicamente con hormonas y puede ser distinto al efecto mitocondrial de PHB (Gamble, et al, 2004).

4) hnRNPL, ribonucleoproteína nuclear heterogénea L, se ha mostrado que esta proteína es necesaria para la proliferación celular y los niveles de esta proteína son regulados a nivel traduccional. Su sobreexpresión se ha observado en varios tipos de cáncer, sin embargo, no se sabe si esta desregulación es una consecuencia de o lleva a la proliferación celular desregulada (Taguchi, 2004; Yaowu, et al, 2005). Por otro lado, Egger y colaboradores en 2006, sugirieron que el perjudicar el ensamble de las subunidades de RNP del spliceosoma, al parecer es responsable de algunas patogénesis como cáncer.

Por otra parte, como se sabe el ensamble de los exones en mamíferos durante el splicing es comúnmente mediado por la actividad de silenciadores del splicing exónico (ESSs) y hnRNPL ha sido identificada recientemente como un regulador de ESS en células T y tiene una actividad silenciadora adicional, debido a que reprime la inclusión de exones de una manera ESS-dependiente (Rothrock, et al, 2005; Egger, et al, 2006).

5) TRIP12, proteína 12 que interactúa con el receptor de hormona tiroidea (TR), es una proteína ubiquitin ligasa E3 y contiene un dominio HECT, nombrado así porque esta asociado con la ubiquitinación y ribosilación con poli-ADP. El TR también pertenece a la superfamilia de NRs y muestra activación similar a los miembros de la familia de hormonas esteroides, por lo tanto es probable que TRI12 también pueda interactuar con AR (Aravind, 2001; Strausberg, et al, 2002).

6) PBX3 factor de transcripción 3 de células de leucemia, pertenece a una familia que comprende una gran clase de reguladores transcripcionales que contienen un homeodominio atípico de 63 aminoácidos. Este dominio se pliega en hélice-horquilla-hélice y comprende un motivo de unión a DNA de tres alfa hélices. PBX3 es el resultado del splicing alternativo producido por dos transcritos de los genes *PBX3A* y *PBX3B*. La familia PBX tiene secuencia de aminoácidos altamente conservada entre sus miembros y entre especies (Piper et al., 1999).

Se han encontrado dos isoformas de PBX3, denominadas PBX3C y PBX3D que surgen de un splicing diferente en la región 5' del mRNA de *PBX3*, sugiriendo un potencial diferente entre los transcritos de células normales comparadas con células de leucemia. Al parecer las células de cáncer tienen preferencialmente seleccionado un equilibrio favoreciendo la isoforma PBX3C, la cual puede conferir una ventaja distinta a este tipo de células (Milech et al, 2001).

Se sabe que PBX3 interactúa con PREP1 y se ha observado que este factor es un coactivador, debido a que aumenta la actividad transcripcional del complejo PBX/HOX unido al DNA (Ferretti et al., 1999) y de acuerdo a este modelo las nuevas isoformas de PBX3 podrían ser incapaces de traslocar PREP1 al núcleo e inhibir el efecto de aumentar la actividad del complejo PBX3C(D)/HOX, porque la interacción entre estas dos proteínas se da en una región NH₂ terminal que les falta a estas proteínas (Berthelsen et al., 1999).

Por otro lado, Quin y colaboradores en 2004, demostraron que la expresión de PBX3 es regulada por ácido retinóico, de manera transcripcional y post-traducciona. La acción del ácido retinóico es mediada por el receptor de ácido retinóico (RAR) y por el receptor X retinoide (RXR), los cuales al igual que el AR pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Además al igual que AR, las proteínas PBX están en citoplasma, cuando interactúan con MEIS o PREP sufren un cambio conformacional y exponen una señal de localización

nuclear y se transloca la proteína dimérica al núcleo (Saleh et al., 2000), en donde ejerce su función de regulador transcripcional al unirse al DNA. Además se ha demostrado que mutaciones en PBX3 pueden promover el síndrome de hipoventilación central congénito (Rhee et al., 2004).

Se encontraron dos proteínas citoplásmicas HSP90 y CDC37, ambas ya se han reportado como proteínas que interactúan con AR y las dos se han identificado como chaperonas.

HSP90, proteína de choque térmico 90, es una chaperona molecular dependiente de ATP que facilita el plegamiento de numerosas proteínas involucradas en la traducción de señales en la célula. Las proteínas que interactúan con HSP90 llevan a cabo funciones que están involucradas en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y supervivencia (Yun y Matts 2005). Entre estas proteínas se encuentran factores transcripcionales como AR y otros RN. En este sentido mantiene en una conformación estable al receptor en ausencia de ligando y es importante para la unión del mismo (MacLean, 1997).

CDC37, proteína 37 del ciclo de división celular, es una cochaperona cinasa de HSP70 y HSP90. Está asociada con el plegamiento de cinasas y su unión a AR ocurre en el LBD y depende parcialmente de HSP90 en presencia de hormona. Los estudios muestran que CDC37 no se intercambia con HSP90, sugiriendo que ésta funciona en un paso distinto en la vía de activación de AR (Rao, 2001).

CDC37 es capaz de interactuar con y/o estabilizar a c-Src independiente de HSP90 en mioblastos. (Yun et al, 2005). Una interacción funcional de AR con CDC37 se ha mostrado y es requerida para la activación transcripcional del receptor, en adición, a su interacción con HSP90. Además, la actividad de

unión de cinasas de CDC37 requiere de su fosforilación por la caseína cinasa 2, una cinasa dependiente de HSP90.

También se encontraron proteínas ribosomales y mitocondriales, Principalmente se encontró citocromo C oxidasa subunidad II tres veces en el tamizado y un citocromo B. Se ha reportado que citocromo c oxidasa subunidad Vb interactúa con hAR estimulado por HSP70 en presencia de DHT (Beauchemin, 2001).

Por otro lado, se tiene la hipótesis que las irregularidades en la función mitocondrial están involucradas en neoplasias y la supresión de la expresión de la ubiquinona 1 alfa subcomplejo 1 NADH, puede representar una clave para el mecanismo patogénico en el desarrollo de cáncer (Mamelak, et. al, 2005). En este trabajo se encontraron dos proteínas de este tipo, Ubiquinona 1 alfa subcomplejo 3 NADH (Ubq3) y Ubiquinona 1 alfa subcomplejo 5 NADH (Ubq5).

Ubq3, la reportó recientemente Pearce, A. en 2005, sin embargo, aún no esta publicada, aunque se encuentra en el GenBank, descrita como un nuevo gen que codifica para la dTDP-D-glucosa 4, 6-dehidratasa, posiblemente ortóloga de ratón y este nuevo gen codifica para Ubq3, con un peso molecular de 9kDa. La Ubq5, es una deshidrogenasa de 13 kDa que se encuentra en el interior de la membrana mitocondrial y participa en el transporte de electrones. Por lo que se sugiere, que alguna de estas proteínas podría estar interactuando con AR en citoplasma dentro de alguna vía de señalización no genómica en cáncer de próstata recurrente.

Dentro del grupo de proteínas no caracterizadas, se encontró SERF2 o factor 2 rico en EDRK pequeños. SERF2 se descubrió en adenocarcinoma de colon, pero no se ha descrito su función. Esta proteína tiene dos sitios para fosforilación en la región NH₂ terminal, uno para amidación, uno para unir grupos miristilo y uno para involucrina. El primer sitio de fosforilación es un

blanco específico para proteínas cinasas dependientes de cAMP y cGMP. Ambos tipos de cinasas al parecer tienen preferencia por la fosforilación de residuos de serina o treonina que se encuentran en por lo menos dos residuos básicos consecutivos en la región NH₂ terminal, en esta secuencia el motivo es ¹⁶KKQS¹⁹. El otro sitio de fosforilación es ²¹SVK²³, *in vivo* es blanco de la proteína cinasa C, que exhibe una preferencia por la fosforilación de residuos de serina o treonina que se encuentran cerca de un residuo básico, la presencia adicional de este residuo básico en la región NH₂ terminal del aminoácido blanco aumenta la V_{max} y la K_m de la reacción de fosforilación.

Los precursores de hormonas y otros péptidos activos que son amidados, son siempre directamente seguidos por un residuo de glicina el cual provee al grupo amino y frecuentemente por lo menos dos residuos básicos consecutivos (Arg o Lys) los cuales generalmente funcionan como un sitio de división para un péptido activo precursor. Aunque todos los aminoácidos pueden ser amidados, los residuos hidrofóbicos neutrales como Val o Phe son buenos sustratos, mientras que los residuos cargados como Asp o Arg son mucho menos reactivos, en este sentido en SERF2 se encontró el motivo ²³KGKR²⁶, que puede ser un sitio de amidación.

El sitio para la unión de un grupo miristilo encontrado en esta proteína es ³⁰GLSAAA³⁵, se sabe que un apreciable número de proteínas eucariotas son aciladas por la adición covalente de miristato, un ácido graso saturado C14, en su residuo NH₂ terminal vía un enlace amida. La secuencia específica de la enzima responsable para esta modificación es la N-miristoil transferasa (NMT), el motivo que reconoce esta enzima es una glicina en el residuo NH₂ terminal, en la posición 2 un residuo sin carga (no puede ser seguido de un residuo cargado o un residuo hidrofóbico), en la posición 5 un residuo pequeño sin carga como Ala, Ser, Thr, Cys, Asn o Gly, y en la posición 6 no debe ir una prolina.

El transcrito variante 7 parecido a NHSL1, se predijo por un análisis computacional automático, este registro fue derivado recientemente de una

secuencia genómica, utilizando un método de predicción de genes, apoyado en mRNA y evidencias EST. Aun no ha sido publicada y se encuentra en el GenBank en [gi|88999371|ref|XM_945448.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi|88999371|ref|XM_945448.1). De acuerdo con el programa PROSITE, tiene un motivo de unión de grupo miristilo (²⁷GLHGSN³²), dos sitios para la fosforilación por la proteína cinasa C (³⁶TYK³⁸, ⁶⁰SEK⁶²) y otro para la fosforilación por la proteína caseína cinasa 2 CK2 (⁶⁹TQPE⁷²), un sitio para glicosilación (⁶³NKTL⁶⁶) y otro para unir un glicosaminoglicano (⁹³SGIG⁹⁶).

De acuerdo con Schwikowski *et. al*, (2000) basado en los datos de Uetz *et. al*, (2000) menciona que existe una fiabilidad en el sistema doble híbrido de 72%, por lo tanto, aproximadamente el 28% de las interacciones pueden ser potencialmente falsos positivos. Por otro lado, se encontraron varias proteínas hipotéticas, y uno de los principios de utilizar el sistema doble híbrido es encontrar nuevas proteínas que interactúen con la proteína carnada de interés, en este caso hAR y caracterizar su interacción.

CONCLUSIONES

Con el sistema de doble híbrido en levaduras se lograron aislar diferentes proteínas, las cuales no han sido reportadas como de interacción con el hAR.

Algunas de las proteínas identificadas fueron: H1FX (Miembro x de la familia de las histonas 1), PBX3 (Factor de transcripción 3) y Prohibitina 2 (PHB2), y no se sabe su relevancia en relación al cáncer recurrente u otro tipo de cáncer

También, se encontraron algunas secuencias previamente anotadas como proteínas hipotéticas en el análisis reportado sobre el genoma humano y uno de los principios del sistema doble híbrido es encontrar este tipo de secuencias para su posterior caracterización. En este grupo tenemos a la secuencia EDRK rica en factor 2 (SERF2), la proteína relacionada con la diferenciación/apoptosis NB4 y el transcrito variante 7 parecido a NHSL1, y sería interesante determinar si realmente se expresan y están interactuando con AR, si esta interacción se da ubicuamente o si sólo se presenta en cáncer de próstata recurrente.

Por último, podemos concluir que el sistema de doble híbrido en levaduras es una herramienta que puede ser utilizada para estudios similares a este, ya que pudimos encontrar algunas proteínas como HSP90 y CDC37, las cuales han sido previamente descritas y se sabe que interactúan con el hAR

PERSPECTIVAS

Utilizar el sistema Gateway para clonar alguna de estas proteínas a un plásmido con epítipo de histidinas y posteriormente pueda ser clonado a un vector de expresión en células de mamífero.

Determinar la interacción *in vitro* de esta proteína con varios dominios del AR. Para comprobar una interacción directa entre estas dos proteínas, para lo cual se pueden llevar a cabo experimentos de pull-down utilizando varios fragmentos del AR fusionados a glutatión-S-transferasa (GST), en presencia o ausencia de diferentes ligandos. Así se podrá dilucidar que regiones de AR son importantes para la interacción de estas proteínas dependiendo del fragmento de AR utilizado.

Si se dio la interacción anterior se podrá comprobar el efecto de este factor sobre la actividad del AR en líneas celulares de cáncer de próstata recurrente. Estos estudios se llevan a cabo midiendo la actividad transcripcional inducida por el AR transfectado sobre genes reporteros de luciferasa en presencia o ausencia de ligandos agonistas y antagonistas. Se espera que un verdadero coactivador incremente la activación inducida por este receptor y un correpresor la inhiba. Inicialmente, se realizarán los estudios en células CV-1 que no expresan concentraciones importantes de receptores de hormonas esteroideas. Se repetirán los experimentos anteriores en células de cáncer de próstata LNCaP y CWR-R1 que expresan concentraciones importantes de AR endógeno.

Finalmente, se podría determinar la especificidad de la proteína identificada estudiando su efecto sobre la actividad de otros receptores nucleares. Los experimentos de activación transcripcional descritos anteriormente se podrían repetir en células CV-1 utilizando otros NR como son: los receptores de estrógenos alfa y beta, glucocorticoides y progesterona.

REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. España. 3ª ed.
- Amler, L.C., D.B. Agus, C. LeDuc, M.L. Sapinoso, W.D. Fox, S. Kern, D. Lee, V. Wang, M. Leysens, B. Higgins, J. Martin, W. Gerald, N. Dracopoli, C. Cordon-Cardo, H.I. Scher, G.M. Hampton. 2000. Dysregulated expression of androgen-responsive and nonresponsive genes in the androgen-independent prostate cancer xenograft model CWR22-R1, *Cancer Research*. 60: 6134–6141.
- Appu, S., Lawrentschuk, N., Grills, R. and Neerhut, G. 2005. Effectiveness of cyproterone acetate in achieving castration and preventing luteinizing hormone releasing hormone analogue induced testosterone surge in patients with prostate cancer. *The Journal of Urology*. 174:140–142.
- Aranda, A. y Pascual, A. 2001, Nuclear hormone receptors a gene expresión. *Physiological Reviews*. 81 (3): 1269 –1304.
- Aravind, L. 2001. The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *TRENDS in Biochemical Sciences* 26(5): 273-275
- Atlas de la Salud 2003. Instituto Nacional de Salud Publica.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struht, K. 1995. *Current protocols in molecular biology*. Vol I.
- Auchus, R. J. 2004. The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 15 (9): 432-438.
- Bacher S , Achatz G , Schmitz M.L., Lamers Marinus C. 2002 Prohibitin and prohibitone are contained in high-molecular weight complexes and interact with a-actinin and annexin A2. *Biochimie*. 84: 1205–1218.
- Baniahmad, A. 2005. Nuclear hormone receptor co-repressors. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 1-9
- Barrera, R. y De la Garza, J. G. 2000, *Biología molecular del cáncer*. In: *Manual de Oncología del Instituto Nacional de Cancerología*. McGraw-Hill Interamericana. México, p. 16-35.
- Bastian, P. J., Palapattu, G. S., Lin, X., Yegnasubramanian, S., Mangold, L. A., Trock, B., Eisenberger, M. A., Partin, A. W. y Nelson, W. G. 2005. Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy. *Clinical Cancer Research*. 11 (11): 4037-4043.
- Baumann CT, Ma H, Wolford R, Reyes JC, Maruvada P & Lim 2001 The glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) localizes in discrete nuclear foci that associate with ND10 bodies and are enriched in components of the 26S proteasome. *Molecular Endocrinology*. 15 485–500.
- Beauchemin, A. M. J., Gottlieb, B., Beitel, L. K., Elhaji, Y. A., Pinsky, L., Trifiro, M. A. 2001. Cytochrome c oxidase subunit Vb interacts with human androgen receptor: A potential mechanism for neurotoxicity in spinobulbar muscular atrophy. *Brain Research Bulletin*. 56 (3/4): 285-297.

Beitel, L., Elhaji, Y., Lumbroso, R., Wing, S., Panet-Raymond, V., Gottlieb, B., Pinsky, L. and Trifiro, M. 2002. Cloning and characterization of an androgen receptor N-terminal-interacting protein with ubiquitin-protein ligase activity. *Journal of Molecular Endocrinology* 29: 41–60

Berthelsen J, Kilstrup-Nielsen C, Blasi F, Mavilio F, Zappavigna V. 1999. The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev.* 13:946–953.

Black. B. E. y Paschal, B. M. 2004. Intranuclear organization of the androgen receptor. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism.* 15 (9): 411-417.

Bohl, C. E., Gao, W., Miller, D. D., Bell, C. E. y Dalton, J. T. 2005. Structural basis for antagonism and resistance of bicalutamide in prostate cancer. *PNAS.* 102 (17): 6201-6206.

Bouterfa HL, Piedrafita FJ, Doenecke D, Pfahl M. 1995. Regulation of H1(0) gene expression by nuclear receptors through an unusual response element: implications for regulation of cell proliferation. *DNA. Cellular Biology.* 14(11):909-19.

Brady, m. e., Ozanne, D. M., Gaughan, L., Waute, I., Cook, S., Neal, D. E. y Robson, C. N. 1999, Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *J Biol Chem.* 274 (25): 17599-17604.

Brinkmann, O., Blok, J., De Ruiter, E., Doesburg, P., Steketee, K., Berrevoets, A. y Trapman, J. 1999, Mechanisms of androgen receptor activation and function. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 69: 307-313.

Caplan, A., Langley, E., Wilson, E. y Vidal, J. 1995. Hormona-dependent transactivation by the human androgen receptor is regulated by a dnaj protein. *The Journal of Biological Chemistry.* 270 (10):5251-5257.

Chang,B.L., S.L. Zheng, G.A. Hawkins, S.D. Isaacs, K.E. Wiley, A. Turner, J.D. Carpten, E.R. Bleecker, P.C. Walsh, J.M. Trent, D.A. Meyers, W.B. Isaacs, J. Xu, Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk, *Human Genetic.* 110 (2002) 122–129.

Chen Q, Chen J, Tao S, Jianhua S, Xu S, Hualiang J. 2004 A yeast two-hybrid technology-based system for the discovery of PPARc agonist and antagonist. *Analytical Biochemistry.* (335): 253-259.

Cheng S, Brzostek S, Lee S, Hollenberg A, and Balk S. 2002. Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor. *Molecular Endocrinology.* 16(7):1492-501

Ciechanover, A., and Schwartz, A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2727–2730.

Cohen, R. N., Brzostek, S., Kim, B., Chorev, M., Wondisford, F. E. y Hollenberg, A. N. 2001. The specific of interactions between nuclear hormone receptors and correpressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Molecular Endocrinology.* 15 (7): 1049-1061.

Coulter, C. L. 2005. Fetal adrenal development: insight gained from adrenal tumors. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 16 (5): 235-242.

Culing, Z., Comuzzi, B., Steiner, H., Bartsch, G. y Hobisch, A. 2004, Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 92: 265-271.

Cummings, A. M. y Kavlock, R. J. 2004. Function of sexual glands and mechanism of sex differentiation. *The Journal of Toxicological Sciences*. 29 (3): 167-178.

Cunha, G. R. y Tuohimaa, P. 2004, Steroids and prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 92: 219-220.

Delage-Mourroux, R., Martini, P., Choi, I., Kraichely, D., Hoeksema, J. and Katzenellenbogen, B. 2000. Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(46):35848–35856.

Dennis A, and O'Malley B. Rush. 2005. Hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 93 :139–151

DGESS (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud). 1999, Compendio mortalidad y morbilidad. México, 59 p.

Dotzlaw, H., Papaioannou, M., Moehren, U., Claessens, F. y Banishmad, A. 2002. Agonist-antagonist induced coactivator and corepressor interplay on the human androgen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 213: 79-85.

Eder, I. E., J. Hoffmann, H. Rogatsch, G. Schafer, D. Zopf, G. Bartsch, H. Klocker, Inhibition of LNCaP prostate tumor growth in vivo by an antisense oligonucleotide directed against the human androgen receptor, *Cancer Gene Ther*. 9 (2002) 117–125.

Edwards, J. and Bartlett, J. 2005. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: modifications to the androgen receptor. And Part 2: androgen-receptor cofactors and bypass pathways. *BJU Internacional*. 95:1320–1335.

Eggert C, Chari A, Lagerbauer B, Fischer U. 2006. Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends in Molecular Medicine*. 12 (3):113-121.

Festuccia, C., Luca, G., Angelucci, A, Millimaggi, D., Muzi, P., Vicentini, C., and Bologna, M. 2005. Additive antitumor effects of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, gefitinib (Iressa), and the nonsteroidal antiandrogen, bicalutamide (Casodex), in prostate cancer cells in vitro. *International Journal Cancer* 115: 630–640.

Ferretti E, Schulz H, Talarico D, Blasi F, Berthelsen J. 1999. The PBX-regulating protein PREP1 is present in different PBX-complexed forms in mouse. *Mech Dev*. 83:53– 64.

Foss, C. A., Mease, R. C., Fan, H., Wang, Y., ravert, H. T., Dannals, R. F., Olszewski, R. T., Heston, W. D., kozikowski, A. P. y Pomper, M. G. 2005. Radiolabeled small-molecule ligands for prostate-specific membrane antigen: in vivo imaging in experimental models of prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 11 (11): 4022-4028.

Freeman, M. R., Cinar, B. y Lu, M. L. 2005. Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 1-7.

Fu, M., Rao, M., Wang, C., Sakamaki, T., Wang, J., Vizio, D. D., Zhang, X., Albanense C., Balk, S., Chang, C., Fan, S., Rosen, E., Palvimo, J. J., Janne, O. A., Muratoglu, S., Avantaggiati, M. L. y Pestell, R. G., 2003. Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Molecular and Cellular Biology*. 23: 8563-8575.

Fu, M., Wang, C., Zhang, Y. y Pestell, R. G., 2004. Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochemical Pharmacology*. 68: 1199-1208.

Gaido, K., Leonard, L., Lovell, S., Gould, J., Babai, D., Portier, C. y McDonnell, D. 1997. Evaluation of Chemicals with Endocrine Modulating Activity in a Yeast-Based Steroid Hormone Receptor Gene Transcription Assay. *Toxicology and applied pharmacology*. 143, 205–212.

Gamble, C, Odontiadis M, Waxman J, Westbrook J, Dunn M, Wait R, Lam E y Bevan C. 2004. Androgens target prohibitin to regulate proliferation of prostate cancer cells. *Oncogene*. 23, 2996–3004.

Gao, W., Bohl, C. y Dalton, J. 2005. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chemical Reviews*. 105(9): 3352-3370.

Gaughan, L., Logan, L. R., Neal, L. E. y Robson, C. N. 2005, Regulation of androgen receptor and histone deacetylase 1 by Mdm2-mediated ubiquitylation. *Nucleic Acids Research*. Vol. 33. No. 1 13-26

Gelmann E. 2002. Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology*,20(13):3001-15. Review.

Gioeli, D., Ficarro, S., Kwiek, J., Aaronson, D., Hancock, M., Catling, A., White, F., Christian, R., Settlage, R., Shabanowitz, J., Hunt, D., and Weber, M. 2002. Androgen receptor phosphorylation. 277(32) . 29304–29314.

Golemis, E. A. Y Serebriiskii, I. 2001, Two-hybrid and other two-components systems. *In: Sambrook, J. y Russell, D. W. Molecular cloning. A laboratory manual*. Vol 3 Cold Spring Harbor. New York, p. 18.6-18.54.

Goto, K., Koizumi, K., Takaori, H., Fujii, Y., Furuyama, Y., Saika, O., Suzuki, H., Saito, K. y Suzuki, K. 2004. Effects of flutamide on sex maturation and behavior of offspring born to female rats treated during late pregnancy. *The Journal of Toxicological Sciences*. 29 (5): 517-534.

Gregory, C. W., He, B., Johnson, R. T., Ford, O. H., Mohler, J. L., French, F. S. y Wilson E. M. 2001, A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res*. 61: 4315-4319.

Grzywacz, M. J., Yang, J-M. y Hait, W. N, 2003, Effect of the multidrug resistance protein on the transport of the antiandrogen flutamide. *Cancer Research*. 63: 2492-2498.

Gsur, A., M. Preyer, G. Haidinger, T. Zidek, S. Madersbacher, G. Schatzl, M. Marberger, C. Vutuc, M. Micksche, Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene, prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk, *Carcinogenesis* 23 (2002) 1647–1651.

H°a°ag, P., Bektic, J., Bartsch, G., Klocker, H. y Eder, I. E. 2005. Androgen receptor down regulation by small interference RNA indices cell growth inhibition in androgen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry &Molecular Biology*. 96(3-4):251-8.

Hall, J., Couse, J. and Korach, K. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal Of Biological Chemistry*. 276(40):36869–36872.

Han, G., Buchanan, G., Ittmann, M., Harris, J. M., Yu, X., DeMayo, F. J., Tilley, W. y Greenberg, N. M. 2005. Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate. *PANS*. 102 (4): 1151-1156.

Hara, T., K. Nakamura, H. Araki, M. Kusaka, M. Yamaoka, Enhanced androgen receptor signaling correlates with the androgenrefractory growth in a newly established MDA PCa 2b-hr human prostate cancer cell subline, *Cancer Research*. 63 (2003) 5622–5628.

He, B., and Kempainen, J. A., and Wilson, E. M. 2000. FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH₂-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (30): 22986-22994.

He, B., Bowen, N. T., Minges, J. T., and Wilson, E. M. 2001. Androgen-induced NH₂- and COOH- terminal interaction inhibits p160 coactivator recruitment by activation function 2. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:1-9.

Heinlein, C. and Chang, C. 2004. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews* 25(2):276–308

Hengen, P. H. 1997. False positives from the yeast two-hybrid system. *Trends in Biochemical Sciences*. Vol. 22 (1): 33-34.

Herness, E. A. y Naz, R. K. 2003. A novel human prostate-specific gene-1 (HPG-1): molecular cloning, sequencing, and its potential involvement in prostate carcinogenesis. *Cancer research*. 63: 329-336.

Hero, M., Jänne, O. A., Nääntö-Salonen, K., Dunkel, L. y Raivio, T. 2005. Circulating antiandrogenic activity in children with congenital adrenal hyperplasia during peroral flutamide treatment. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 90(9):5141-5.

Hicke L 2001 Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*. 2:195–201.

Hickey, T. E., Marrocco, D. L., Amato, F., Ritter, L. J., Norman, R. J., Gilchrist, R. B. y Armstrong, D. T. 2005. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 73(4):825-32.

Hodgson M, Astapova I, Cheng S, Lee L, Verhoeven M, Choi E, Balk S, Hollenberg A. 2005. The androgen receptor recruits nuclear receptor CoRepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists. *Journal of Biological Chemistry*. 280(8):6511-9.

Hong, C. Y., Gong, E. Y., Kim, K., Suh, J. H., Ko, H. M., Lee, H. J., Choi, H. S. y Lee, K. 2005. Modulation of the expression and transactivation of androgen receptor by the basic helix-loop-helix transcription factor pod-1 through recruitment of histone deacetylase 1. *Molecular Endocrinology*. 19(9):2245-57.

Hu, X, Li, Y. y Lazar, M. A. 2001. Determinants of CoRNR-dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors. *Molecular and Cellular Biology*. 21 (5): 1747-1758.

Huang L. and Burlingame A. L.. 2005. Comprehensive mass spectrometric analysis of the 20S proteasome complex. *Methods in enzymology*. 405:187-236.

Hur, E., Pfaff. S. J., Payne, E. S., Gron, H., Buehrer, B. M. y Fletterick, R. J. 2004. Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface. *Plos Biology*. 2: 1-10.

Ikeda, Y., Aihara, K. I., Sato, T., Akaike, M., Yoshizumi, M., Suzaki, Y., Izawa, Y., Fujimura, M., Hashizume, S., Kato, M., Yagi, S., Tamaki, T., Kawano, H., Matsumoto, T., Azuma, H., Kato, S. y Matsumoto, T. 2005. Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Journal of Biological Chemistry*. 280(33):29661-6.

Irvine, R. A., Ma, H., Yu, M. C., Ross, R. K., Stallcup, M. R. y Coetzee, G. A. 2000. Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Human Molecular Genetics*. 9 (2): 267-274.

Jason L., Finn R., Lindsey G, and Ausio J. 2005. Histone H2A ubiquitination does not preclude histone H1 binding, but it facilitates its association with the nucleosome. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(6): 4975–4982,

Jasuja, R., Catlin, D. H., Miller, A., Chang, Y. C., Herbst, K. L., Starcevic, B., Artaza, J. N., Sing, R., Datta, G., Sarkissian, A., Chandsawangbhuwana., Baker, M. y Bhasin, S. 2005. Tetrahydrogestrinone is an androgenic steroid that stimulates androgen receptor-mediated, myogenic differentiation in C3H10T1/2 multipotent mesenchymal cells and promotes muscle accretion in orchidectomized, male rats. *Endocrinology*. 146(10):4472-8.

Jeong, B. C., Hong, C. Y., Chattopadhyay, S., Park, J. H., Gong, E. Y., Kim, H. J., Chun, S. Y. y Lee, K. 2004. Androgen receptor corepressor-19 kDa (ARR19), a leucine-rich protein that represses the transcriptional activity of androgen receptor through recruitment of histone deacetylase. *Molecular Endocrinology*. 19(1): 13-25.

Jia, L., Kim, J., Shen, H., Clark, P. E., Tilley, W. D. y Coetzee, G. A. 2003, Androgen receptor activity at the prostate specific antigen locus: steroidal and non-steroidal mechanisms. *Molecular Cancer Research*. 1: 385-392.

Ju, H., Soo, Y., Bang, H. y Lee, K. 2003. Novel yeast bioassay system for detection of androgenic and antiandrogenic compounds. *Toxicology in Vitro* 17: 237–244

Kampa, M., Nifli, A-P., Charalampopoulos, I., Alexaki, V-I., Theodoropoulos, P. A., Stathopoulos, E. N., Gravanis, A. y Castanas, E. 2005. Opposing effects of estradiol and testosterone membrane binding sites on T47T breast cancer cell apoptosis. *Experimental cell research*. 307: 41-51.

Kuiper G, Faber P, van Rooij H, van der Korput J, Ris-Stalpers C, Klaassen P, Trapman J, and Brinkmann A. 1989. Structural organization of the human androgen receptor gene. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2(3):1-4.

Kikuchi, E., Horiguchi, Y., Nakashima, J., Kuroda, K., Oya, M., Ohigashi, T., Takahashi, N., Shima, Y., Umezawa, K. y Murai, M. 2003, Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor κ B inhibitor in nude mice. *Cancer Research*. 63(1):107-10

Kumura, R. y Thompson, B. 2003, Transactivación functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Molecular Endocrinology*. 17 (1): 1-10.

Langley, E., Zhou, Z. y Wilson, E. 1995. Evidence for an anti-parallel orientation of the ligand-activated human androgen receptor dimer. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(50):29983–29990.

Lee, O. O., Lou, W., Hou, M., de Miguel, F., Gerber, L. y Gao, A. C. 2003, Interleukin-6 promotes androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells. *Clinical Cancer Research*. 9: 370-376.

Letsch, M., Schally, A. V., Busto, R., Bajo, A. M. y varga, J. L. 2003. Growth hormone-releasing hormone (GR.) antagonists inhibit the proliferation of androgen dependent and – independent prostate cancers. *PNAS*. 100 (3): 1250-1255.

Li, W., Cavasotto, C. N., Cardozo, T., Ha, S., Dang, T., Taneja, S. S., Logan, S. K. y Garabedian, M. J. 2005. Androgen receptor mutations identified in prostate cancer and androgen insensitivity syndrome display aberrant ART – 27 coactivator function. *Molecular Endocrinology*. 19(9):2273-82.

Liang-Nian, S., Coghlan, M. y Gelmann, E. 2004. Antiandrogen effects of mifepristone on coactivator and corepressor interactions with the androgen receptor. *Molecular Endocrinology*. 18 (1): 70-85.

Liao, G., Chen, L. Y., Zhang, A., Godavarthy, A., Xia, F., Ghosh, J. C., Li, H. y Chen, D. 2003, Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (7): 5052-5061.

Lim, J. T. E., Mansukhani, M. y Weinstein, I. B. 2005. Cyclin-dependent kinase 6 associates with the androgen receptor and enhances its transcriptional activity in prostate cancer cells. *Medical Sciences*. 102 (14): 5156-5161.

Lin V Y, Resnick E M and Shupnik M A.2003. Truncated estrogen receptor product-1 stimulates estrogen receptor α transcriptional activity by titration of repressor proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (40): 38125-38131.

Linja, M. J. y Visakorpi, T. 2004, Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 92 (2004): 255-264.

Liu, Y., Kim, B. O., Kao, C., Jung, C., Dalton, J. T. y He, J. J. 2004, Tip110, the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) tat-interacting protein of 110 kDa as a negative regulator of androgen receptor (AR) transcriptional activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (21): 21766-21773.

Lonard D, Nawaz Z, Smith C and O'Malley B 2000 The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Molecular Cell*. 5 939–948.

Louie, M. C., Yang, H.Q., Ma, A. H., Xu, W., Zou, J. X., Kung, H. J. y Chen, H. W. 2003. Androgen-induced recruitment of RNA polymerase II to a nuclear receptor-p160 coactivator complex. *PNAS*. 100 (5): 2226-2230.

Loy, C. J., Sim, K. S. y Yong, E. L. 2003. Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *PNAS*. 100 (8): 4562-4567.

Lubahn D, Joseph D, Sullivan P, Willard H, French F, and Wilson E. 1988. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science*. 240(4850):327-30.

Lue, Y., Jentsch, J. D., Wang, C., Rao, N. P., Hikim, A. P. S., Salameh, W. y Swerdloff, R. S. 2005. XXY mice exhibit gonadal and behavioral phenotypes similar to klinefelter syndrome. *Endocrinology*. 146(9):4148-54.

Maita, K., Kuwahara, M., Kosaka, T., Inui, K., Sugimoto, K., Kashimoto, Y., Takahashi N. y Harada, T. 2004. The effect of testosterone propionate supplement on testicular toxicity with thiamphenicol in male Sprague-Dawley rats. *The Journal of Toxicology Sciences*. 29 (3): 187-193.

Mamelak A, Kowalski J, Murphy K, Yadava N, Zahurak M, Kouba D, Howell B, Tzu J, Cummins DL, Liegeois N, Berg K, Sauder D. 2005. Downregulation of NDUFA1 and other oxidative phosphorylation-related genes is a consistent feature of basal cell carcinoma. *Exp Dermatol.* 14(5):336-48.

Manninen, T., Purmonen, S. y Ylikomi, T. 2005. Interaction of nuclear receptors with HSP90 in living cells. *Journal of Steroid & Molecular Biology.* 96(1):13-8.

Markus, S. M., Taneja, S. S., Logan, S.K., Li, W., Ha, S., Hittelman, A. B., Rogatsky, I. y Garabedian, M. J. 2002. Identification and characterization of ART-27, a novel coactivator for the androgen receptor N terminus. *Molecular Biology of the Cell.* 13: 670-682.

Martínez, P. F., Jiménez, M. A. y Capdeville, D. 2000. Cáncer de próstata. *En: Manual de Oncología del Instituto Nacional de Cancerología.* McGraw-Hill Interamericana. México, p. 440-450.

Martínez, E. D., Pattabiraman, N. y Danielsen, M. 2005. Análisis of the hormone-binding domain of steroid receptors using cimeras generated by homologous recombination. *Experimental Cell Research.* 308 (2005): 320-333.

Martini, P. y Katzenellenbogen, B. 2003. Modulation of estrogen receptor activity by selective coregulators. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 85: 117–122

Matias, P., Donner, P., Coelho, R., Thomaz, M., Peixoto, C., Macedo, S., Otto, N., Joschko, S., Scholz, P., Wegg, A., Bäsler, S., Schäfer, S., Egner, U. and Larrondo, M. 2000. Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. *The Journal of Biological Chemistry.* 275(34):26164–26171.

McKenna, N. J., Lanz, R. B., y O'Malley, B. W. 1999, Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews.* 20(3): 321-344.

McLean, M, Panzarella, T. Warde, P. Gospodarowicz, M. Duncan, W. Catton C. and Bissett R. 1997. Prostate specific antigen levels during radical radiation therapy and the prediction of outcome in localized carcinoma of the prostate. *Clinical Oncology.* 9:226-233

Milech N, Kees U., and Watt P. 2001. Novel alternative PBX3 isoforms in leukemia cells with distinct interaction specificities. *Genes, Chromosomes & Cancer.* 32:275–280

Miller, G. J., Miller, H. L., van Bokhoven, A., Lambert, J. R., Werahera, P. N., Schirripa, O., Lucia, M. S. y Nordeen, S. K. 2003. Aberrant HOXC expresión accompanies the malignant phenotype in human prostate. *Cancer Research.* 63: 5879-5888.

Mishra S, Murphy L., Nyomba G and Murphy L. 2005. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends in Molecular Medicine.* 11(4): 192-197.

Miyata, K., Yabushita, S., Sukata, T., Sano, M., Yoshino, H., Nakanishi, T., Okuno, Y. y Matsuo, M. 2002. Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormones and androgen-dependent organsin F1 male rats. *The Journal of Toxicological Sciences.* 27 (1): 19-33.

Miyata, K., Yabushita, S., Sano, M., Miyashita, K., Okuno, Y. y Matsuo, M. 2003. Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormone responsiveness in F1 male rats. *The Journal of Toxicological Sciences.* 28 (3): 149-163.

Moilanen, A., Rouleau, N., Ikonen, T., Palvimo, J. y Jaënne, A. 1997. The presence of a transcription activation function in the hormone-binding domain of androgen receptor is revealed by studies in yeast cells. *Federation of European Biochemical Societies.* 412: 355-358

Mousses, S., Wagner, Y. Chen, J. Kim, L. Bubendorf, M. Bittner, T. Pretlow, A. Elkahloun, J. Trepel, O. Kallioniemi, Failure of hormone therapy in prostate cancer involves systematic restoration of androgen responsive genes and activation of rapamycin sensitive signaling, *Oncogene*. 20 (2001) 6718–6723.

Nawaz, Z., Lonard, D., Dennis, A., Smith, C. y O'Malley, B. 1999. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96 1858–1862.

Nijtmans, L., Artal, A., Grivell, L. and Coates, P. 2002. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59: 143–155

Nishimura, K., Ting, H. J., Harada, Y., Tokizane, T., Nonomura, N., Kang, H. Y., Chang, H. C., Ye, S., Miyamoto, H., Shin, M., Aozasa, K., Okuyama, A. y Chang. C. 2003. Modulation of androgen receptor transactivation by gelsolin: a newly identified androgen receptor coregulator. *Cancer research*. 63: 4888-4894.

Okada, A., Sato, T., Ohta. Y. y Iguchi, T. 2005. Sex steroid hormone receptors in the developing female reproductive tract of laboratory rodents. *The Journal of Toxicological Sciences*. 30 (2): 75-89.

Petre, D. C. E., Cook, S. L., Burd, C. J., Marshall, T. W., Wetherill, Y. B. y Knidsen, K. E. 2003. Specificity of cyclin D1 for androgen receptor regulation. *Cancer Research*. 63: 4903-4913.

Pichard, V., and Ferry, N. 2005. Long term phenobarbital administration does not promote the multiplication of hepatocytes replicating after single cyproterone acetate administration. *Life Sciences*. 76:3057–3068

Pickart, C. 2001. Ubiquitin enters the new millennium. *Molecular Cell* 8: 499–504.

Piper D, Batchelor A, Chang C, Cleary M, Wolberger C. 1999. Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell*. 96:587–597.

Poukka H, Aarnisalo P, Karvonen U, Palvimo J and Jänne O. 1999 Ubc9 interacts with the androgen receptor and activates receptor-dependent transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 274 19441–19446.

Qin P, Haberbusch J., Soprano K., and Soprano D, 2004. Retinoic acid regulates the expression of PBX1, PBX2, and PBX3 in P19 cells both transcriptionally and post-translationally. *Journal of Cellular Biochemistry*. 92:147–163

Rahman, M. M., Miyamoto, H., Takatera, H., Yeh, S., Altuwajiri, S. y Chang, C. 2003a. Reducing the agonist activity of antiandrogens by a dominant-negative androgen receptor coregulator ARA70 in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (22):19619-26.

Rahman, M. M., Miyamoto, H., Lardy, H. y Chang, C. 2003b. Inactivation of androgen receptor coregulator ARA55 inhibits androgen receptor activity and agonist effect of antiandrogens in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(9): 5124–5129.

Rao, J., Lee, P., Benceno, S., Cardozo, C., Albertus, J., Robins, D. M. y Caplan, A. J. 2001. Functional interaction of human Cdc37 with the androgen receptor but not with the glucocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (8): 5814-5820.

Reid, K., Hendy, S. y Saito, J. 2001. Two classes of androgen receptor elements mediate cooperativity through allosteric interactions. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 2943-2952.

Rhee J, Arata A, Selleri L, Jacobs Y, Arata S, Onimaru H and Cleary M. 2004. Pbx3 deficiency results in central hypoventilation. *American Journal of Pathology*. 165(4): 1343- 1350.

Rothrock, C., House, A., Lynch, K. 2005. HnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer. *EMBO Journal* 24 (15) 2792-2802.

Sack J, Kish K, Wang C, Attar R, Kiefer S, An Y, Wu G, Scheffler J, Salvati M, Krystek S, Weinmann R, and Einspahr H. 2001. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *PNAS*. 98(9):4904-9.

Saleh M, Huang H, Green NC, Featherstone M. 2000. A conformational change in PBX1A is necessary for its nuclear localization. *Experimental Cell Research*. 260:105–115.

Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Ahihara, K. I., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P. y Kato, S. 2004. Brain masculinization requires androgen receptor function. *PNAS*. 101 (6): 1673-1678.

Saunders, P. T. K. Does estrogen receptor b play a significant role in human reproduction? 2005. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 16 (5): 222-227.

Schally, A. V. y Nagy, A. 2004. Chemotherapy targeted to cancers through tumoral hormone receptors. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 15 (7): 300-310.

Schaufele, F., Carbonell, X., Guerbodot, M., Borngraeber, S., Chapman, M- S., Ma, A. K., Miner, J. N. y Diamond, M. I. 2005. The structural basis of androgen receptor activation: Intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *PNAS*. 102 (28): 9802-9807.

Schneider, J. S., Burgess, C., Sleiter, N. C., DonCarlos, L. L., Lydon, J. P., O'Malley, B. y Levine, J. E. 2005. Enhanced sexual behaviors and androgen receptor immunoreactivity in the male progesterone receptor knockout (PRKO) Mouse. *Endocrinology*. 146(10):4340-8.

Schwikowski, B. Uetz, P. and Fields, S. 2000. A network of protein–protein interactions in yeast. *Nature Biotechnology*. 18:1257-1261

Shaffer, P. L., Jivan, A., Dollins, D. E., Claessens, F. y Gewirth, D. T. 2004. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *PNAS*. 101 (14): 4758-4763.

Shang Y, Myers M, and Brown M. 2002. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molecular Cell*. 9(3):601-10

Sharma, M., Zarnegar, M., Li, X., Lim, B. y Sun, Z. 2000. Androgen receptor interacts whit a novel MYST protein, HB01. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (45): 35200-35208.

Sharma, M. y Sun, Z. 2001. 5'TG3' interacting factor interacts with Sin3A and represses AR-mediated transcription. *Molecular Endocrinology*. (15)11: 1918-1928.

Sheflin, L., Keegan, B., Zhang, W. y Spaulding, W. 2000. Inhibiting proteasomes in human HepG2 and LNCaP cells increases endogenous androgen receptor levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276: 144–150.

- Siddique, Y. y Afzal, M. 2005. Genotoxic potential of cyproterone acetate: a possible role of reactive oxygen species. *Toxicology in Vitro*. 19: 63–68.
- Song L, Coghlan M, Gelmann E. 2004. Antiandrogen effects of mifepristone on coactivator and corepressor interactions with the androgen receptor. *Molecular Endocrinology*. 18(1):70-85
- Strausbergab, R., Feingoldc, E., Grouse, L., Derged, J., Klausnera, R. and Collinsc, F. 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *PNAS*. 99(26):16899–16903.
- Sun, L., Liu, L., Yang, X. J. y W, Z. 2004. Ark binds prohibitin 2 and relieves its repression of MyoD and muscle differentiation. *Journal of Cell Science*. 117(14):3021-3029.
- Suzuki, H., K. Akakura, A. Komiya, T. Ueda, T. Imamoto, Y. Furuya, T. Ichikawa, M. Watanabe, T. Shiraishi, H. Ito. 2002. CAG polymorphic repeat lengths in androgen receptor gene among Japanese prostate cancer patients: potential predictor of prognosis after endocrine therapy, *Prostate*. 51:219–224.
- Suzuki, H., Ueda, T., Ichikawa, T y Ito, H. 2003. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 10: 209-216.
- Taguchi F, Kusaba H, Asai A, Iwamoto Y, Yano K, Nakano H, Mizukami T, Saijo N, Kato H, Nishio K. 2004. hnRNP L enhances sensitivity of the cells to KW-2189. *International Journal of Cancer*. 108(5):679-85.
- Terashima M., Kwang-Myo K., Takahiro A., Nielsen P., Reth M., Kohler G. and Lamers M. 1994. The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 13(1):3782-3792,
- Th'ng J., Sung R, Ye M, and Hendzel M. 2005. H1 family histones in the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (30): 27809–27814,
- Titus, M. A., Gregory, C. W., Ford, O. H., Schell, M. J., Maygarden, S. J. y Mohler, J. L. 2005. Steroid 5 α -reductase Isozymes I and II in recurrent prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 11 (12): 4365-4371.
- Tortora, G. J. y Anagnostakos, N. P. 1991. Principios de anatomía y fisiología. México, Harla. 3^a ed.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Quershi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnson, M., Fields, S. y Rothberg, J. M. 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saacharomyces cerevisiae*. *Macmillan Magazines Ltd*. 403: 623-631.
- Varriale, B. y Esposito, T. 2005. The hamster androgen receptor promoter: A molecular analysis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 94 (2005): 103-110.
- Wafa, L. A., Cheng, H., Rao, M. A., Nelson, C. C., Cox, M., Hirst, M., Sadowski, I. y Rennie, P. S. 2003. Isolation and identification of L-dopa decarboxylase as a protein that binds to and enhances transcriptional activity of the androgen receptor using the repressed transactivator yeast two-hybrid system. *Biochemical Journal*. 375: 373-383.
- Wang, X., Yeh, S., Wu, G., Hsu, C. L., Wang, L., Chiang, T., Yang, Y., Guo, Y. y Chang, C. 2001, Identification and characterization of a novel androgen receptor coregulator ARA267 – α in prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (44): 40417-40423.

Wang S, Fusaro G, Padmanabhan J and Chellappan S. 2002. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene*. 21: 8388 – 8396

Weissman A. 2001 Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*. 2:169–178.

Whitaker, H. C., Hanrahan, S., Totty, N., Gamble, S. C., Waxman, J., Cato, A. C. B., Hurst, H. C. y Bevan, C. L. 2004. Androgen receptor is targeted to distinct subcellular compartments in response to different therapeutic antiandrogens. *Clinical Cancer Research*. 10: 7392-7401.

Wientejes, M. G., Zheng, J. H., Hu, L., Gan, Y. y Au, J. L. S. 2005. Intraprostatic chemotherapy: distribution and transport mechanisms. *Clinical Cancer Research*. 11 (11): 4204-4211.

Wytenbach A, Carmichael J, Swartz J, Furlong R., Narain Y, Rankin J, and Rubinsztein D. 2000. Effects of heat shock, heat shock rotein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97 (6): 2898–2903.

Xiao, F., Mirwald, A., Papaioannou, M., Baniahmad, A. y Klug, J. 2005. Secretoglobin 2A1 is under selective androgen control mediated by a peculiar binding site for Sp family transcription factors. *Molecular Endocrinology*. 19(12):2964-78.

Xin, L., Lawson, D. A. y Witte, O. N. 2005. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *PNAS*. 102 (19): 6942-6947.

Xu, J. y Li, Q. 2003, Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Molecular Endocrinology*. 17 (9): 1681-1692.

Xu, L. L., Shi, Y., Petrovies, G., Sun, C., Makarem, M., Zhang, W., Sesterhenn, I. A. McLeod, D. C., Sun, L., Moul, J. W. y Srivastava, S. 2003, PMEPA1, an androgen-regulated NEDD4-binding protein, exhibits cell growth inhibitory function and decreased expression during prostate cancer progression. *Cancer Research*. 63: 4299-4304.

Yaowu H, Brown M, Rothnagel J, Saunders N. and Smith, R. 2005 “Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation “. *Journal of Cell Science*. 118 (14): 3173-3183.

Ye, X., Han, S. J., Tsai, S. Y., DeMayo, F. J., Xu, J., Tsai, M. J. y O'Malley, B. W. 2005. Roles of steroid receptor coactivator (SRC)-1 and transcriptional intermediary factor (TIF)2 in androgen receptor activity in mice. *PNAS*. 102 (27): 9487-9492.

Yun, B. G. y Matts, R. L. 2005. Differential effects of HSP90 inhibition on protein kinases regulating signal transduction pathways required for myoblast differentiation. *Experimental Cell Research*. 207(2005): 212-223.

Zegarra-Moro, O.L., Schmidt L, Huang H., Tindall D., Disruption of androgen receptor function inhibits proliferation of androgen-refractory prostate cancer cells, *Cancer Research*. 62 (2002) 1008–1013.

Zhang, L., Jhonson, M., Le, K. H., Sato, M., Ilagan, R., Iyer, M., Gambhir, S. S., Wu, L. y Carey, M. 2003, Interrogating androgen receptor function in recurrent prostate cancer. *Cancer Research*. 63: 4552-4560.

Zhang, Y., Wang, X. W., Jelovac, D., Nakanishi, T., Yu, M., Akinmade, D., Goloubeva, O., Ross, D. D., Brodie, A. y Hamburger, A. W. 2005. The ErbB3-binding protein Ebp1 suppresses androgen receptor-mediated gene transcription and tumorigenesis of prostate cancer cells. *PNAS*. 102 (28): 9890-9895.

Zhou Z, Lane M, Kemppainen J, French F, and Wilson E. 1995. Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Molecular Endocrinology*. 9(2):208-18.

Zhou Z, Kemppainen J, Wilson E. 1995. Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. *Molecular Endocrinology*. 9(5):605-15.

ANEXO 1

Medios de cultivo, buffers y soluciones

MEDIOS DE CULTIVO

BACTERIAS

Medio LB (por litro)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	12g (solo para cajas)

Medio SOC

Triptona	2 %
Extracto de levadura	0.5 %
KCl	2.5 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM
pH 7	

LEVADURAS

Medio YPDA (por litro)

Difco peptone	20 g
Extracto de levadura	10 g
Adenina hemisulfatada	0.003 %
Dextrosa	2 %
Agar	20 g (solo para cajas)

Medio SD (por litro)

(NH ₄)SO ₄	5 g
Base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos	1.7 g
H ₂ O	850 mL
Apropiada solución	
Dropout 10X (aminoácidos)	100 mL
Dextrosa	2 %
Agar	20 g (solo para cajas)
pH 5.8	

Suplemento Dropout 10X (puede esterilizarse por autoclave y guardarse a 4°C por 1 año)

L-Adenina hemisulfatada	200 mg/L
L-Arginina HCl	200 mg/L
L-Histidina HCl monohidratada	200 mg/L
L-Isoleucina	300 mg/L
L-Leucina	1000 mg/L
L-Lisina HCl	300 mg/L
L-Metionina	200 mg/L
L-Fenilalanina	500 mg/L
L-Treonina	2000 mg/L
L-Triptofano	200 mg/L
L-Tirosina	300 mg/L
L-Uracilo	200 mg/L
L-Valina	1500 mg/L

BUFFERS

TE

Tris-base 200 mM
EDTA 20 mM

TE/LiAc

TE + LiAc 0.1 M (pH 7.5, ajustarlo con AcOH)

Buffer Z

Na₂HPO₄ • 7H₂O 16.1 g/L
NaH₂PO₄ • H₂O 5.50 g/L
KCl 0.75 g/L
MgSO₄ • 7H₂O 0.246g/L
Ajustar pH 7.0, esterilizar por autoclave.

Buffer Z + β- mercaptoethanol

A 100 ml de buffer Z, agregarle 0.27 ml de β-mercaptoethanol.

Buffer de lisis de levaduras

Triton X-100 2%
SDS 1%
NaCl 100mM
Tris-Cl, pH 8 10mM
EDTA, pH 8 1mM

Buffer de lavado y extracción (por litro)

Solución de fosfato de potasio 100mM
EDTA 1mM

pH 7.5, ajustar con KOH

OTRAS SOLUCIONES

PEG/LiAc

PEG 4000 40% + Solución TE/LiAc

ONPG

ONPG (o-nitrofenil b-D-galactopiranosida)
4 mg/ml en Z buffer. pH 7.0.

Preparar al momento de usarse. Se disuelve en 2 hrs. aproximadamente.

X-gal

Disolver 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosida en N,N-dimetilformamida (DMF) a concentración de 20 mg/ml. Guardar en oscuridad a -20°C.

Solución GTE

Glucosa 50mM
Tris-Cl pH8 25mM
EDTA 10mM

3-4 AT

3-4 AT 1M (3-amino-1,2,4-triazol) preparar en H₂O deionizada y filtrar para esterilizar. Guardar a 4°C